

LIZANDRA CZERMAINSKI BRETANHA

Estudo fitoquímico da espécie *Senecio brasiliensis*: isolamento químico e determinação de algumas propriedades físico-químicas dos compostos isolados

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Doutor em Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr.Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis, SC - Brasil

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC.

Bretanha, Lizandra C.
Estudo fitoquímico da espécie *Senecio brasiliensis*:
isolamento químico e determinação de algumas propriedades
físico-químicas dos compostos isolados / Lizandra C.
Bretanha ; orientador, Moacir G. Pizzolatti –
Florianópolis, SC, 2014.
217 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Estudo fitoquímico espécie *Senecio*
Brasiliensis. 3. Técnicas de separação, EC, HPLC/MS/MS. 4.
Propriedades físico-química envolvidas nos processos
farmacodinâmicos ADMET. 5. Investigação dos alcaloides
pirrolizidinicos em amostras de mel. I. Pizzolatti, Moacir
G.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Química. III. Título.

LIZANDRA CZERMAINSKI BRETANHA

Estudo fitoquímico da espécie *Senecio brasiliensis*: isolamento químico e determinação de algumas propriedades físico-químicas dos compostos isolados

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química área de concentração química orgânica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 22 de Agosto de 2014.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Programa

Banca examinadora:

Prof. Moacir G. Pizzolatti, Dr.
Orientador
QMC-UFSC

Prof^a. Michele D. Alberton Dr^a
(FURB-DQ)

Prof. Marcone A. L. de
Oliveira, Dr. (relator)
QMC – UFJF(MG)

Prof^a. Maíque W. Biavatti Dr^a.
(DCF/UFSC)

Prof. Fernando G. Tonin, Dr.
(FZEA – USP)

Prof^a. Inês M. C. Brighente Dr^a.
QMC-UFSC

Este trabalho é dedicado a todos que acreditaram em mim, e que acompanharam minha jornada confiante que tudo iria dar certo. Em especial aos meus filhos (e neto), minha mãe e meu namorado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus amados filhos Vitória, Chandler e Nicolas, pela paciência e amor incondicional, quando tive que sair de perto de vocês para seguir adiante na minha jornada. Vocês nunca deixaram de acreditar na minha busca, sempre orgulhosos de cada passo meu. Sem a aprovação e o incentivo de vocês, nada disso teria sido possível.

Agradecer a Deus pela força que nunca me deixou enfraquecer diante das dificuldades, e ainda trouxe a minha vida um neto Gabriel que desde já me traz felicidade e uma nora parceira, Maira Balleste que sempre está ao meu lado com seu sorriso acolhedor e suas frases engraçadas.

Agradecer principalmente ao meu namorado Gustavo Micke, por todas as horas de carinho, companheirismo, paciência, trabalho e ensinamentos. Esse trabalho faz parte de nós, foi feito em quatro mãos.

Gostaria de agradecer ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti, por todos os ensinamentos e orientações.

Aos colegas e amigos do LQPN: Leko pelas boas risadas, Ana pelas conversas animadas, Henrique, Gustavo baiano pelo acolhedor carinho desde o início do doutorado, tornaram-se irmãos para mim. Aos que já defenderam Lu, Frã e Heros pelo tempo de amizade. Ao IC Hugo pela colaboração em massa no meu trabalho, e em especial a grande amiga Dalila Venzke, gostaria de agradecer imensamente por todas as vezes que você foi especial demais, fez papel de irmã, de filha, de psicóloga, de animadora. Tudo foi bem mais fácil de passar, porque eu tive você para conversar.

Gostaria de agradecer aos amigos do LABEC Melina, Marcel, Ju, Dani e em especial ao Alysson e Maressa pela colaboração neste trabalho

Aos secretários da pós-graduação Jadir e Graça por toda vez que precisei de ajuda e fui atendida prontamente, meu muito obrigado.

Ao programa de pós-graduação e aos órgãos de fomento a pesquisa CNPq, CAPES e ao INCT e LABEC que permitiram que esse projeto fosse realizado.

A empresa Farma Service BioExtract, pela oportunidade de desenvolver trabalhos onde busquei aperfeiçoar meus conhecimentos, bem como obter outros.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais

voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho visou realizar um estudo fitoquímico analítico da espécie vegetal *Senecio brasiliensis*. Após o preparo do extrato bruto de diferentes partes da planta, foi desenvolvido um procedimento sistemático utilizando eletroforese capilar como guia para o subsequente isolamento dos constituintes químicos. O procedimento aplicado permitiu verificar a presença de alcalóides, flavonóides e ácidos dicafeoilquínicos. Com o uso de técnicas espectroscópicas RMN, IV, EI-MS e ESI-MS foi possível identificar os alcalóides como senecionina, senecioidina N-óxido, os ácidos x,y-dicafeoilquínicos 3,5, 3,4, 4,5 e 1,4, além dos flavonóides rutina e quercetrina. Para o estudo da distribuição dos alcalóides na planta, foi desenvolvido um método utilizando eletroforese capilar. A determinação de log P para os alcalóides foi efetuada através da EC, utilizando um mecanismo de separação em MEKC (cromatografia micelar capilar). O modelo obtido para os padrões foi $\log P = x \log k - y$ ($n=6$, $R^2 = 0.91$) com log P variando de 0,4 – 4,08. O valor de log P para a N-óxido senecionina foi determinado como $< 0,4$ e para a senecionina 0,7. Para a determinação da interação dos alcalóides pirrolizidínicos com albumina humana foi utilizado eletroforese capilar no modo PF-ACE. Ambos os compostos não apresentaram interação com a proteína humana. Para a determinação da permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA) foi utilizada a técnica eletroforese capilar para as análises de permeabilidade. Com a finalidade de determinar alcalóides pirrolizidínicos em amostras de mel com diluição simples foi desenvolvido método utilizando HPLC-MS/MS

Palavras-chave: alcalóides, senecionina, N-óxido, EC, LVI, isolamento, PeakMaster, injeções múltiplas, log P, PAMPA, mel

ABSTRACT

This study aimed to carry out a phytochemical study of *Senecio brasiliensis* species under an analytical perspective. After preparation of the crude extract from different parts of plant, a systematic procedure using capillary electrophoresis (CE) as a guide for the subsequent isolation of the chemical constituents was developed. The procedure demonstrated the presence of alkaloids, flavonoids and dicaffeoylquinic acids. Using spectroscopic techniques (NMR, IR, EI-MS and ESI-MS) it was possible to identify the alkaloids senecionine[1] and N-oxide senecionine[2]; the x,y-dicaffeoylquinic acids (3,5)[3], (3,4)[4], (4,5)[5] and (1,4)[6] and also the flavonoids rutin[7] and quercetin[8]. To study the distribution of alkaloids in the plant, a novel method using CE was developed. For determining the log P for alkaloid, CE technique was used in MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) mode. The model obtained for the standards was $\log P = x \log k - y$ ($n = 6$, $R^2 = 0.91$) with log P ranging from 0.4 to 4.08. The k values for senecionine and N-oxide senecionine were determined as 0.7 and <0.4, respectively. To evaluate the interaction between pyrrolizidine alkaloids and human albumin (HSA), CE in PF-ACE (Partial-Filling Affinity Capillary Electrophoresis) mode was applied. The results suggest that both compounds do not present interaction with the studied protein. To determine the permeability of these alkaloids, experiments were carried out using parallel artificial membrane (PAMPA) and CE was used to analyze all solutions. In order to determine pyrrolizidine alkaloids in honey samples with simple dilution, a method using HPLC-MS/MS was developed.

Key world: alkaloids, senecionine, N-oxide, CE, LVI, isolation, PeakMaster, multiple injection, log P, PAMPA, honey

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET - Administração, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxidez
APs - Alcaloides Pirrolizidínicos
NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
ATP - Adenosina Triphosphate
PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PVDF - fluoreto de polivinilideno
CAE - camada de água estacionária
DMSO - Dimetil sulfoxido
HPLC- High Performance Liquid Chromatography
MS - Mass Spectroscopy
FEO - Fluxo Eletrosmótico
DAD - Diode Array Detection
TBS - Tetraborato de sódio
BGE - Background electrolyte
EC - Eletroforese Capilar
PGA - Phosphoglycerate
HP- β -CD - hidroxipropil beta ciclodextrina
UV - Ultra violeta
MeOH - metanol
CHCl₃ - Clorofórmio
NH₄OH - Hidróxido de amônio
IV - Infravermelho
IS - Internal Standart
FI - Força Iônica
EMD - Eletromigração por Dispersão
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação
PF-ACE - Patial Fillin- Affinity Capillary Electrophoresis.
ED - Equilíbrio de Diálise
UF - Ultra Filtração
RPS - Ressonância de Plasma de Superfície
UC - Ultra Centrifugação
LC - Liquid Chromatograph
CE - Capillary Electrophoresis
ECA - Eletroforese Capilar por Afinidade
DOVH - Doença Oclusiva Veno- Hepática
HIBA - ácido 2-hidroxiisobutilico
TRIS - tris(hidroximetil)aminoetano

MES - ácido2-(N-morfolino)etanosulfônico

D.I - diâmetro interno

D.E diâmetro externo

CCA - Centro de Ciências Agrárias

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fragmentações características dos alcalóides pirrolizidínicos.....	58
Tabela 2: Identificação de ácidos cafeoilquínicos utilizando o método “Hierarchical key” por LC-MS (Clifford, 2005).	66
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do alcalóide Senecionina [1] (experimental e da literatura)	72
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C : experimentos e da literatura do alcalóide N-óxido Senecionina [2]	76
Tabela 5: Parâmetros para determinar senecionina [1] e N-óxido senecionina[2] no extrato.	88
Tabela 6: Série de compostos utilizados na determinação de log P.....	93
Tabela 7: Tabela de parâmetros de figuras de mérito	107
Tabela 8: Resultados de permeabilidade dos alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] isolados a partir da espécie <i>S. brasiliensis</i>	110
Tabela 9: Curva de calibração para o método proposto para determinação de alcalóides em mel.	121
Tabela 10: Dados de quantificação (em $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) de alcalóides senecionina[1] e N-óxido senecionina [2] presente em amostras de mel	123
Tabela 11: Parâmetros MS/MS para senecionina m/z 336 e senecionina N-óxido m/z 352	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Alcalóides presentes no Gênero <i>Senecio</i>	7
Figura 2: Ilustração da planta	8
Figura 3: <i>Senecio brasiliensis</i> em campo de pastagem na regial Sul do Brasil	9
Figura 4: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações	12
Figura 5: Formação de base de Schiff, rota geral dos intermediários para a biossíntese de alcalóides	14
Figura 6: Alcalóides provenientes da rota metabólica de aminoácidos.....	15
Figura 7: Algumas formas encontradas para os alcalóides pirrolizidínicos.....	16
Figura 8: Rota biossintética para a formação dos alcalóides pirrolizidínicos.....	17
Figura 9: Eletroferogramas dos extratos brutos da planta sob as mesmas condições: (A) flores; (B) folhas; e (C) caules,	45
Figura 10: Eletroferogramas dos compostos fenólicos presente no extrato bruto das flores da espécie <i>Senecio brasiliensis</i> . Somente a amostra.....	48
Figura 11: Eletroferograma obtido do extrato bruto das flores da espécie <i>Senecio brasiliensis</i> , em pH = 9 e 350 nm, (A) extrato bruto após o procedimento de hidrólise (B).	50
Figura 12: Análise de espectroscopia de infravermelho. (A) espectro de IV compostos [1] e (B) espectro de IV composto [2].	54
Figura 13: Conformação do grupo OH na molécula.....	56
Figura 14: Espectro do perfil de fragmentação dos alcalóides	58
Figura 15: Espectro de massa dos compostos presentes na espécie <i>Senecio brasiliensis</i> . (A) senecionina [1] e (B) senecionina N-óxido [2].	60

Figura 16: Perfil cromatográfico da fração aquosa (A) e espectro de massa da quercetina- <i>O</i> -rutosideo [7] (B) e quercetina- <i>O</i> -glucosideo [8] (C) presente na espécie <i>Senecio brasiliensis</i>	61
Figura 17: Perfil cromatográfico dos ácidos cafeoilquínicos por HPLC-DAD (A). Procedimento “hierarchical key”. Espectro de massa por HPLC-MS/MS para MS1 (B), MS3 (C) e MS2 (D) do composto majoritário ácido 4,5-dicafeoilquínico (3) presente na espécie <i>Senecio brasiliensis</i>	64
Figura 18: Correlação heteronuclear HMBC.....	72
Figura 19: Gráfico da mobilidade efetiva versus pH para os alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2]	83
Figura 20: Sobreposição dos eletroferogramas: (A) experimental (Peakmaster electroferograma gerado) e (B) simulado.	86
Figura 21: Eletroferogramas dos extratos das folhas (A) e flores (B).	90
Figura 22: Eletroferograma de experimento log P para os medicamentos.	94
Figura 23: Eletroferogramas do experimento para a determinação de log P para senecionina[1] e N-óxido senecionina[2]	95
Figura 24: Método modelo para a determinação de interação proteína-droga por Partial Filling	99
Figura 25: Dados simulados esperados para o Modelo Partial Filling	100
Figura 26: Gráfico do experimento interação de proteína com senecionina [1] e N-óxido senecionina[2]	100
Figura 27: Eletroferograma experimental.....	104
Figura 28: Eletroferograma simulado para a determinação da permeabilidade	105
Figura 29: Eletroferograma obtido usando múltiplas injeções para a determinação dos analitos nas soluções doadora, aceptora e equilíbrio	110

Figura 31: Gráfico de análise do fator de retenção com aumento de porcentagem de açúcar na amostra	116
Figura 32: Gráfico de análise do fator de retenção com aumento de volume de injeção	117
Figura 33: Figura (Xa) cromatograma da análise em modo negativo sem a utilização do procedimento de remoção do açúcar e (Xb) com a válvula de descarte	118
Figura 34: Cromatograma XA amostra de mel sem ajuste de pH (pH 6.43), Cromatograma XB amostra de mel com ajuste de pH (pH = 10)	120
Figura 35: Cromatograma de padrões em 1 µg L ⁻¹	121
Figura 36: Cromatograma de amostra de mel contendo alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2]	123
Figura 37: Análise de alcalóides pirrolizidinico senecionina[1] presente em amostras de mel: comercial (A) e fornecidos pela CCA (B)	124
Figura 38: Espectro de RMN ¹ H do alcalóide pirrolizidinico senecionina [1]	186
Figura 39: Espectro de RMN de ¹³ C de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1].....	187
Figura 40: Espectro de DEPT 135 de alcalóides pirrolizidinico Senecionina [1].....	188
Figura 41: HMQC de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1]	189
Figura 42: HMBC de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1]	190
Figura 43: Espectro de RMN ¹ H do alcalóide pirrolizidinico N-óxido senecionina[2]	193
Figura 44: Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide pirrolizidinico N-óxido Senecionina[2].....	194
Figura 45: Espectro de RMN DEPT 135 do alcalóide pirrolizidinico N-óxido Senecionina[2].....	195

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1: Determinação da mobilidade efetiva	42
Equação 2 Calculo para a determinação do pKa	80
Equação 3 Equação de ONSANGER	82
Equação 4: Equação da curva da mobilidade iônica versus pH	83
Equação 5: Equação para obtenção de pH ótimo para a determinação da mobilidade iônica	84
Equação 6: Calculo do fator de retenção K	92
Equação 7: Estimativa de numero de injeções para corrida em eletroforese capilar	104
Equação 8: Determinação de limite de injeções	106
Equação 9: Determinação de limite de detecção	108
Equação 10: Determinação de limite de quantificação	109
Equação 11: Determinação da constante de permeabilidade	150
Equação 12: Determinação de retenção de membrana	151

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	XIII
SUMÁRIO.....	XIV
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
O GÊNERO SENECIO	6
A ESPÉCIE SENECIO BRASILIENSIS	7
METABOLISMO VEGETAL	10
ALCALÓIDES	12
<i>Biossíntese de alcalóides</i>	<i>14</i>
<i>Alcalóides pirrolizidínicos (APs).....</i>	<i>15</i>
DETERMINAÇÃO E DIRECIONAMENTO PARA O ISOLAMENTO DE COMPOSTOS PRESENTES NAS ESPÉCIES VEGETAIS.....	18
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS FARMACOCINÉTICOS DE ADMET.	20
<i>Mecanismos de absorção de compostos</i>	<i>21</i>
<i>Tipos de transporte de compostos através de membranas biológicas.....</i>	<i>22</i>
<i>Fatores físico-químicos e absorção de compostos</i>	<i>25</i>
PERMEABILIDADE EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA).....	30

<i>Condições gerais do ensaio de PAMPA</i>	31
ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS NA DIETA HUMANA	34
3. Objetivos	38
OBJETIVO GERAL	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. Resultados e Discussões	41
A ELETROFORESE CAPILAR COMO GUIA NO ISOLAMENTO FITOQUÍMICO	42
<i>Determinação dos alcalóides</i>	44
<i>Determinação de compostos fenólicos</i>	47
<i>Determinação de flavonóides</i>	49
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO	51
<i>Isolamento dos compostos</i>	51
<i>Análise de espectroscopia de infravermelho Infra Vermelho</i>	53
<i>Figura 13: Conformação do grupo OH na molécula</i> ..	56
<i>Análises de CG/MS dos compostos isolados</i>	56
IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS POR HPLC-DAD-MS/MS	59
<i>Análises de RMN dos compostos isolados</i>	67
<i>Dados de RMN do alcalóide senecionina [1]</i>	67
<i>Dados de RMN do alcalóide N-óxido senecionina [2]</i> 73	
DETERMINAÇÃO DE pKa E MOBILIDADE IÔNICA DOS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS. QUANTIFICAÇÃO DA SENECONINA [1] E N-ÓXIDO SENECONINA [2] NOS EXTRATOS DA FLOR E FOLHA DA ESPÉCIE SENECONIA BRASILIENSIS	77
a) <i>Determinação do pKa</i>	80
b) <i>Determinação da mobilidade iônica</i>	82
c) <i>Validação de dados</i>	87
d) <i>Análises das amostras</i>	89

USO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO FERRAMENTA ANALÍTICA NA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE ADMET.....	90
<i>Determinação do coeficiente de partição e log P utilizando eletroforese capilar.....</i>	<i>91</i>
DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS SENECONINA [1] E N-OXIDO SENECONINA [2] COM ALBUMINA HUMANA UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR NO MODO PF-ACE PATIAL FILLIN- AFFINITY CAPILLARY ELECTROPHORESIS.....	97
<i>Eletroforese capilar como ferramenta analítica na determinação da permeabilidade artificial em membrana paralela (PAMPA).....</i>	<i>102</i>
<i>Resultados obtidos para a determinação de permeabilidade em membrana.....</i>	<i>103</i>
<i>b) Figuras de mérito.....</i>	<i>106</i>
<i>c) Aplicação da Metodologia desenvolvida.....</i>	<i>109</i>
DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES SENECONINA [1] E N-OXIDO SENECONINA [2] EM AMOSTRAS DE MEL POR TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-MS)	111
<i>Porcentagem de açúcar.....</i>	<i>114</i>
<i>Otimização do volume de injeção.....</i>	<i>116</i>
<i>Avaliação do tempo necessário para remover os açúcares presentes na amostra.....</i>	<i>117</i>
<i>Efeito do pH no fator de retenção dos analitos.....</i>	<i>119</i>
<i>Validação cromatográfica.....</i>	<i>120</i>
<i>Aplicações do método.....</i>	<i>122</i>
5. Conclusões.....	125
6. Metodologias.....	132

METODOLOGIA PARA EXPERIMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR COMO GUIA NO ISOLAMENTO FITOQUÍMICO.....	133
<i>Reagentes soluções</i>	133
<i>Obtenção da planta e preparo do extrato bruto</i>	134
<i>Sistema de eletroforese capilar</i>	134
<i>Preparação das soluções padrões e amostras para CE</i>	135
<i>Condições eletroforéticas para screening fitoquímico</i>	136
<i>Isolamento fitoquímico</i>	137
<i>Sistema HPLC-DAD-MS/MS</i>	139
<i>Condições para identificação estrutural - HPLC-DAD-MS/MS</i>	140
<i>Sistema de Infravermelho</i>	142
<i>Sistema CG/MS</i>	142
<i>Sistema de RMN</i>	143
DETERMINAÇÃO DE PKA E MOBILIDADE IÔNICA DOS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS. QUANTIFICAÇÃO DA SENECONINA [1] E N-OXIDO SENECONA[2] NOS EXTRATOS DA FLOR E FOLHA DA ESPÉCIE SENECON BRASILIENSIS.	144
<i>Materiais e métodos</i>	144
<i>Reagentes e soluções</i>	144
<i>Obtenção do extrato</i>	145
<i>Sistema Capilar eletroforese</i>	145
<i>Condições eletroforéticas</i>	146
<i>Determinação da mobilidade iônica</i>	146
<i>Determinação do pka</i>	147
DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO LOG P POR ELETROFORESE CAPILAR.....	147
<i>Parte experimental</i>	147
<i>Equipamentos</i>	148

DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE EM MEMBRANA PARALELA PAMPA POR ELETROFORESE CAPILAR.....	149
<i>Ensaio de permeabilidade</i>	<i>149</i>
<i>Procedimento experimental utilizando eletroforese capilar.....</i>	<i>152</i>
<i>Reagentes e soluções</i>	<i>152</i>
<i>Instrumentação e procedimento eletroforético.</i>	<i>153</i>
DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM AMOSTRAS DE MEL	153
<i>Curvas de calibração.....</i>	<i>156</i>
<i>Preparação de amostras.....</i>	<i>156</i>
7. Referências.....	157
8. Anexos.....	183

1.Introdução

O Brasil por ser um país com grandes áreas de cerrados, planaltos, mata atlântica possui uma variada biodiversidade de plantas com amplo uso na medicina popular. Muitas das quais tem sido objeto de estudos químicos, fitoquímicos, farmacológicos dentre outros. Embora uma grande quantidade de espécies já tenha sido estudada, ainda existe uma lacuna a respeito do conhecimento de muitas espécies medicinais.

As plantas representaram durante séculos a única fonte de agentes terapêuticos para tratamento de várias doenças e com o desenvolvimento na química farmacêutica, ocuparam uma posição de destaque na descoberta de moléculas “design” para o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, várias plantas servem de objeto de estudos fitoquímicos e farmacológicos, o que levou a um aumento significativo no uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica. Segundo Hostettmann *et al* 25 % dos medicamentos prescritos no mundo são de origem vegetal e 120 compostos são de origem natural, obtido a partir de 90 espécies de plantas. Neste contexto, 44% dos medicamentos utilizados são de origem natural, sendo 6% proveniente de produtos naturais, 5% biológicos, 24 % derivados de produtos naturais e 9% sintéticos modelados a partir de estruturas

isoladas de produtos de origem natural (Hostettmann, 2003).

O presente trabalho destaca o estudo fitoquímico com avaliação das propriedades físico-químicas, químicas e biológicas da espécie *Senecio brasiliensis*, uma espécie que tem sido um problema no setor agropecuário da região Sul. Algumas espécies do gênero *Senecio*, apresentam grande importância botânica, fitoquímica, farmacológica e principalmente do ponto de vista toxicológico, por apresentar em sua constituição química alcalóides com núcleo pirrol conhecidos por sua toxidez, muito embora alguns trabalhos apontem estas estruturas como potencialmente benéficas no tratamento de algumas doenças (Toma, W. *et al.*, 2004). Contudo, a toxicidade atribuída aos alcalóides é devido aos metabólitos resultantes das reações de hidrólise enzimática decorrentes do metabolismo no fígado.

Levando em conta a importância clínica de fármacos e outros tipos de compostos ingeridas e suas vias metabólicas, e do quanto eles podem ser tóxicos ao organismo humano, foi proposto neste trabalho uma investigação das propriedades ADMET dos alcalóides isolados a partir da espécie *Senecio brasiliensis* através de métodos analíticos visando conhecer melhor o

comportamento dos alcalóides enquanto permeiam no sistema biológico.

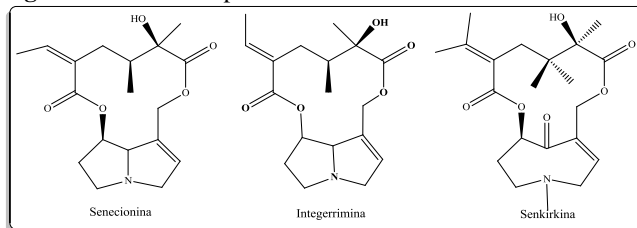
2.Revisão Bibliográfica

O Gênero Senecio

O gênero *Senecio*, pertencente a família Asteraceae, compreende mais de 1500 espécies distribuídas em todo o mundo (Loizzo *et al.*, 2004), apresentando importância botânica, fitoquímica, farmacológica em função de sua constituição química apresentar alcalóides com núcleo pirrol (Nori-Shargh, Raftari e Deyhimi, 2008; Langel, Ober e Pelser, 2011). Estes alcalóides são oriundos do metabolismo secundário e servem como mecanismo de defesa para a planta. A literatura relata mais de 350 estruturas de diferentes alcalóides, aos quais é atribuída em sua grande maioria, a sua toxicidade (Reinhard, Janke, Von Der Ohe, *et al.*, 2009). No entanto, segundo dados encontrados na literatura algumas espécies do gênero *Senecio* tais como *S. inaequidens*, *S. Vulgaris* e *S. heterotrichus*, tem uso na medicina tradicional como anti-inflamatórios, antieméticos, vasodilatadores (Loizzo *et al.*, 2004), antimicrobianas, fungicidas (Francescato *et al.*, 2007), antitumorais (Toma, Walber *et al.*, 2004) antimalarias (Nguta *et al.*, 2010) e leishmanicida (Rocha, 2005). Os alcalóides pirrolizidínicos apresentam-se na forma de estruturas de diésteres macrocíclicos podendo conter uma ou mais hidroxilas, sendo os mais representativos do

gênero *Senecio* os alcalóides senecionina, integerrimina e senkirina (Figura 1)

Figura 1: Alcalóides presentes no Gênero *Senecio*

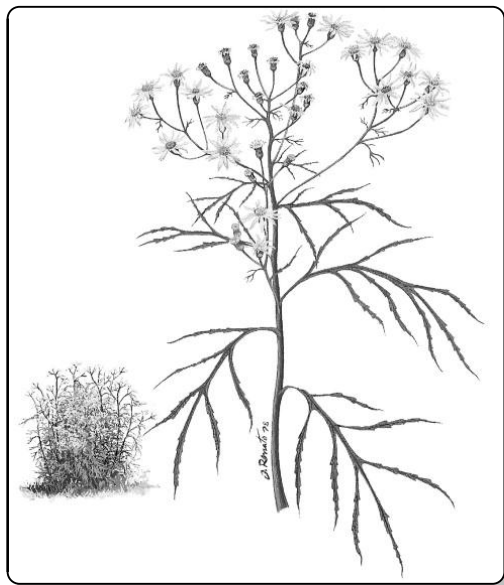


A espécie Senecio brasiliensis

A espécie *Senecio brasiliensis*, é uma planta bastante conhecida por sua hepatotoxicidade em animais, causando uma doença chamada seneciose. No entanto, segundo Hirschmann e colaboradores, a espécie *S. brasiliensis* possui em sua constituição química alcalóides pirrolidizínicos com capacidade de produzir atividade antiulcerogênica, quando administrada na forma de extrato metanólico (Hirschmann *et al.*, 1987). Em uma pesquisa realizada por Toma e colaboradores, os autores apontam o alcalóide integerrimina presente no extrato metanólico da espécie *S. brasiliensis*, como o responsável pela atividade anti-ulcerogênica (Toma, Walber *et al.*, 2004).

A espécie *Senecio brasiliensis* é uma planta perene, com talos eretos, estriados, ramosos, densamente folhosos, com 1-2 m de altura, com folhas alternadas pinatipartidas, com época de inflorescência em outubro e novembro. Apresenta-se como subarbusto ocorrendo em bordas de mata, campo alterado e área urbanizada. Sua presença é mais concentrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (MT, MG, RJ, SP, PR, SC e RS) Uruguai e Nordeste da Argentina (Fernandes, 2009). (Figura 2)

Figura 2: Ilustração da planta



Fonte: www.plantillustrations.org

Quanto a forma como a espécie *S. brasiliensis* é conhecida, esta possui sinonímia científica de *Cineraria brasiliensis* Spreng. Possui vários nomes populares, podendo ser conhecida como: "tasneirinha", "catião", "erva-lanceta", "flor-das-almas", "malmequer amarelo", "craveiro do campo" e "maria-mole", na França é conhecida como petit seneçon e na Inglaterra como groundsel ou birdessed. Trata-se de uma espécie de uso ornamental, mas pouco apreciada devido ao fato de abrigar pequenos insetos (Figura3). Constitui uma planta melífera (procurada por abelhas para a produção de mel). Na medicina popular, suas folhas secas são utilizadas no tratamento de feridas, queimaduras e alergias.

Figura 3: *Senecio brasiliensis* em campo de pastagem na região Sul do Brasil



Fonte: www.panoramio.com

É uma espécie silvestre que invade terrenos cultivados e pastagens, não sendo muito apreciada na agropecuária, devido sua toxicidade quando ingerida pelo gado. Esta toxicidade é segundo a literatura em função da presença de alcalóides pirrolizidínicos insaturados, considerados marcadores taxonômicos do gênero (Simões, 2010).

Metabolismo vegetal

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nas células vegetais assim como em outros, o metabolismo é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos com funções essenciais no vegetal, tais como: fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário são os aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e clorofila, e estes possuem uma distribuição universal nas plantas. Por outro lado, o metabolismo secundário dá origem aos compostos que não possuem uma distribuição universal, tão poucos são encontrados em todas as plantas.

Desta forma, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos (quimiosistemática). (Peres, 2011)

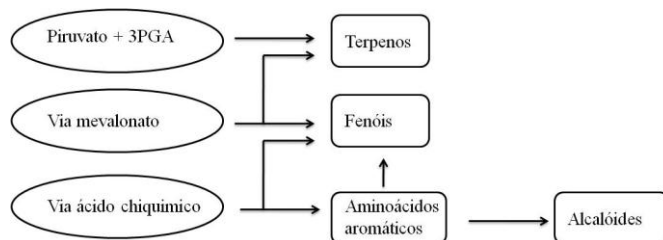
Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Desse modo, produtos secundários podem desempenhar um papel contra a herbivoria, ao ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbioses. Os produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais. (Peres, 2011)

Em geral, existem três principais grupos de metabólitos secundários nos vegetais: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Figura 4). Os terpenos são oriundos do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico mais acetato ou do ácido mevalônico. E por último, os alcalóides são produtos do metabolismo de aminoácidos aromáticos (triptofano,

tirosina) derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina)(Dewick, 2002).

Em geral, compostos oriundos do metabolismo secundário são produzidos por três vias: piruvato, mevalonato e ácido chiquímico. (Figura 4)

Figura 4: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações



Alcalóides

Nas plantas, os alcalóides constituem num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural. Estes compostos são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens ou tecidos mortos. Acumulam-se preferencialmente em uma ou mais partes: folha, flor ou caule. Conforme suas funções podem atuar nos tecidos de crescimento ativo, células epidérmicas e

hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Em sua maioria, são armazenados no mesmo local onde são sintetizados, podendo também ser transportado de um compartimento para outro na planta.

Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, oriundos do metabolismo dos aminoácidos e são encontrados predominantemente em angiospermas. Na sua grande maioria os alcalóides possuem caráter alcalino, já que a presença do átomo de nitrogênio representa um par de elétrons não compartilhados, e são classificados de acordo com sua estrutura e rota biogenética (Ugaz, 1994; Peres, 2011). Por outro lado, existem alcalóides de caráter ácido, como por exemplo, a colchicina.

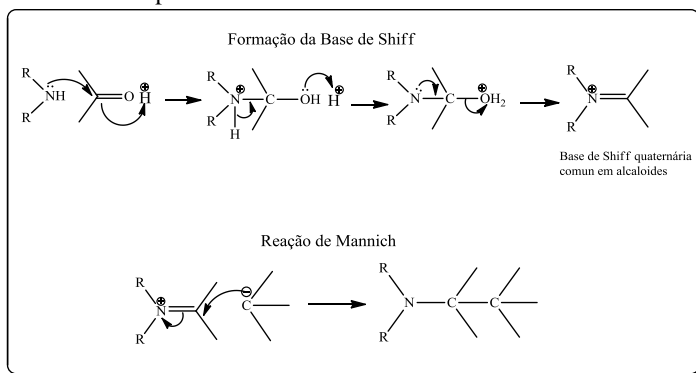
As plantas que produzem alcalóides, geralmente são conhecidas pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos. Em geral, são evitadas por insetos, ou por animais em sua dieta, devido ao fato destes compostos apresentarem sabor amargo, ou porque são em sua maioria tóxicos. Esta última particularidade lhe confere um papel de defesa contra invasão de microrganismos ou de vírus nas plantas (Witte *et al.*, 1992) podendo também exercer a função de reserva

de nitrogênio e regulador crescimento em alguns casos (Simões, 2010).

Biossíntese de alcalóides

A biossíntese dos alcalóides é um tema bastante complexo, sobre tudo em função da grande quantidade de enzimas envolvidas no processo. A princípio, o sistema alcaloídico ocorre via formação da base de Schiff e consequente reação do tipo Mannich (**Figura 5**) (Dewick, 2002).

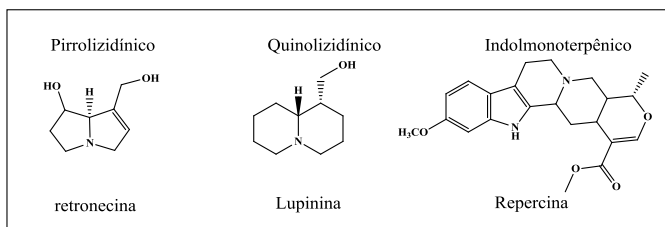
Figura 5: Formação de base de Schiff, rota geral dos intermediários para a biossíntese de alcalóides



No entanto, a origem biogenética dos alcalóides não é explicada em apenas uma reação. A biossíntese em si resulta na combinação de várias rotas distintas envolvendo vários processos metabólicos. De uma maneira geral, o que

se pode afirmar é que os átomos de nitrogênio presente nos alcalóides são oriundos do metabolismo de aminoácidos como, por exemplo, a L-ornitina, L-lisina e L- triptofano, dentre outros. O anel heterocíclico resultante do metabolismo destes aminoácidos fornece a estrutura básica para sua classificação, dando origem às várias classes de alcalóides tais como: os alcalóides pirrolizidínicos, quinolínicos , indólicos entre outros (Figura 6).

Figura 6: Alcalóides provenientes da rota metabólica de aminoácidos

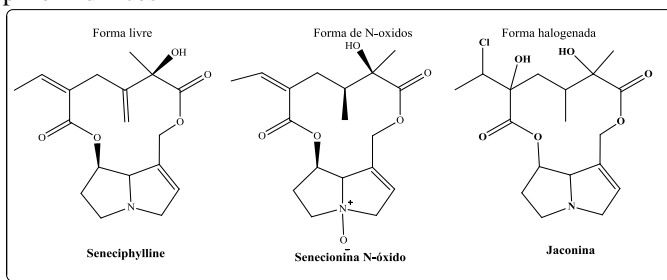


Alcalóides pirrolizidínicos (APs)

Os alcalóides pirrolizidínicos são encontrados de diversas formas, podendo se apresentar na forma de base nitrogenada livre, na forma de N-óxido, ou ainda na forma halogenada (**Figura 7**), essa última forma pode ser resultado de artefatos gerados durante o procedimento de isolamento. Os alcalóides contendo átomos de oxigênio ligado ao nitrogênio (N-óxidos) podem sofrer

decomposição térmica durante o processo de secagem, resultando em estruturas sem o átomo de oxigênio, um exemplo deste fenômeno é a senecionina, um alcalóide resultante da decomposição térmica do N-óxido senecionina.

Figura 7: Algumas formas encontradas para os alcalóides pirrolizidínicos

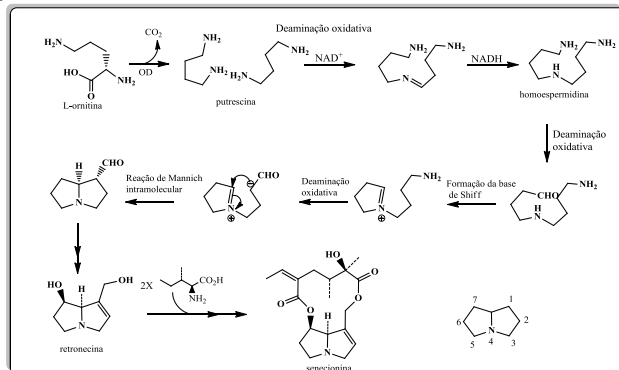


Do ponto de vista biogenético, tanto as necinas quanto os alcalóides pirrolizidínicos são formados durante o metabolismo da L-ornitina, pouco frequente na natureza.

A rota biogenética (**Figura 8**) para a formação dos APs começa a partir de duas unidades de L-ornitina. Este aminoácido através de um processo enzimático (ornitina descarboxilase) sofre descarboxilação originando o intermediário putrescina. A condensação de duas unidades de putrescina via reação de deaminação oxidativa NAD^+ dependente origina a imina correspondente, que por sua vez sofre reação de redução originando o intermediário homospermidina.

O intermediário homoespermidina através de uma deaminação oxidativa regioseletiva origina um aldeído intermediário, resultando na formação de uma base de Schiff pelo ataque do nitrogênio secundário. Através de um processo de desaminação oxidativa e consequentemente uma reação de Mannich intramolecular, o heterociclo pirrolizidínico retronecina é então formado. As reações de hidroxilação e desidratação das necinas originam as retronecinas, que por sua vez são as precursoras dos alcalóides pirrolizidínicos (AP's). (Dewick, 2002)

Figura 8: Rota biossintética para a formação dos alcalóides pirrolizidínicos



DETERMINAÇÃO E DIRECIONAMENTO PARA O ISOLAMENTO DE COMPOSTOS PRESENTES NAS ESPÉCIES VEGETAIS

A determinação de propriedades bioativas de plantas é muito importante para aplicações farmacológicas. É através de estudos fitoquímicos que novas drogas são descobertas. As investigações fitoquímicas são muito complexas e se utilizam de técnicas clássicas de extração/purificação/separação que são efetuados para isolar e elucidar compostos bioativos. Até que seja totalmente desvendada a estrutura que promove tal atividade leva-se muito tempo, principalmente quando não dá relatos na literatura sobre a espécie a ser estudada (Brusotti, 2013).

Em recente trabalho realizado por Brusotti *e colaboradores*, o autor descreve o importante papel de análises no isolamento e caracterização de bioativos de plantas usando uma abordagem etnofarmacológica. Conforme Brusotti as análises são aplicadas em numerosos passos durante os processos de extração, separação e purificação, mas certas metodologias são mais adequadas para "localizar e seguir" o processo de atividade farmacológica que pode estar ligado a um ou mais compostos (Brusotti *et al.*, 2013). Além disso, técnicas

hifenadas e biocromatografia oferecem vantagens de triagem de alto rendimento (high-throughput screening) que permitem a rápida identificação de compostos a partir de um extrato bruto.

Uma variedade de metodologias pode ajudar na determinação de constituintes de uma planta, a maior parte do tempo esta pesquisa é feita de maneira empírica, levando em conta, dados da literatura de espécies semelhantes. Perde-se freqüentemente muito tempo e ao final do processo se obtém pequeníssimas quantidades de compostos.

O uso de técnicas combinadas antes do processo de fracionamento e de extração para o isolamento e identificação, pode orientar de forma eficaz a busca de metabólitos secundários em uma planta, poupando tempo e facilitando na pesquisa. Assim, técnicas combinadas podem conduzir o estudo direto de certas estruturas químicas. Neste contexto, o uso de eletroforese capilar, acoplado com DAD vem servir como ferramenta auxiliar nas investigações fitoquímicas preliminares, visto que se trata de uma técnica que permite análises muito rápida de baixo custo e com pequeníssimas quantidades de amostras.

***PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS
ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS
FARMACOCINÉTICOS DE ADMET.***

As propriedades físico-químicas de drogas influenciam diretamente na sua atividade biológica, sendo apropriado se referir a elas como propriedades biofarmacêuticas. Exemplos de tais propriedades incluem solubilidade, coeficientes de partição óleo/água, difusividade, grau de ionização, polimorfismo, que, em suma, são determinadas pela estrutura química das substâncias. Estas propriedades estão intimamente relacionadas com a fase farmacocinética (ADMET), repercutindo diretamente na sua biodisponibilidade e no tempo de meia vida do fármaco. Por sua vez, a estrutura química (incluindo a estereoquímica) é essencial para a ação de um composto em um alvo farmacológico (fase farmacodinâmica)(Block, 1998).

Para um determinado fármaco, haverá uma diferença entre disponibilidade fisiológica (biodisponibilidade) e resposta clínica. Isso porque tanto as propriedades físico-químicas quanto o reconhecimento ao alvo farmacológico devem ser apropriados para sua ação total. Isto é atribuído ao fato de que um fármaco, deve não

só atravessar várias membranas biológicas e interagir com fluidos inter e intracelulares, como também agir de forma apropriada no seu alvo. Sob estas condições, as propriedades biofarmacêuticas podem contribuir para facilitar a absorção e distribuição para aumentar a concentração de um composto dentro da célula. Além do mais, importância está no fato de que estas propriedades podem facilitar uma orientação específica na superfície do receptor, para que uma sequência de eventos seja iniciada, a fim de levar ao efeito farmacológico observado. Substâncias escassas das propriedades biofarmacêuticas adequadas podem exercer ação farmacológica precária ou em ser totalmente ineficazes.

Mecanismos de absorção de compostos

Para a absorção dos fármacos é necessária, na grande maioria dos casos a transposição de membranas biológicas. Estas membranas são as do trato gastrointestinal (principal) ou respiratório e vascular. Outras membranas podem estar envolvidas na distribuição dos fármacos no organismo, como as membranas da barreira hematoencefálica (Thomas, 2003).

Tipos de transporte de compostos através de membranas biológicas

Os tipos de transporte através de membranas podem ser transporte ativo, passivo e mediado (menos comum).

a) Transporte ativo (grande maioria dos fármacos): onde se determina a tendência de uma molécula de se mover de um compartimento de maior concentração para outro de menor, a fim de atingir o equilíbrio. Nesse tipo de transporte há o gasto de energia (na forma de ATP).

b) Transporte passivo ocorre na tendência de equilibrar as forças sobre o soluto. Se for um soluto carregado, existirá força química e elétrica sobre ele e o fluxo resultante é diferente de zero até o momento em que essas forças se tenham o mesmo módulo e sentidos contrários no soluto carregado. No caso de um soluto não carregado, existe apenas a força química aplicada sobre o soluto e quando a força deixar de existir, pela igualdade das concentrações, o fluxo resultante do íon será nulo. Moléculas hidrofóbicas, alguns gases como o oxigênio e o nitrogênio, por exemplo, conseguem passar facilmente pela membrana e entrar na célula. Pequenas moléculas

polares não carregadas, como água, glicerol, conseguem entrar na célula, mas tem maior dificuldade. Grandes moléculas polares não carregadas tais como glicose, sacarose, conseguem entrar, mas muito pouco, pela membrana. Íons, como Na^+ , K^+ , não conseguem entrar na célula pela membrana. Vale ressaltar que existem os chamados canais iônicos, que são proteínas transmembranas dispostas de maneira a formar um canal, que permitem a entrada dos íons na célula. Trata-se de um transporte que ocorre sem gasto de energia externa ao sistema e ocorre a favor do gradiente eletroquímico, ou seja, vai do maior gradiente para o menor, no caso de um soluto carregado ou a favor do gradiente de concentração, do mais concentrado para o menos concentrado, no caso de um soluto não carregado. Pode ocorrer então a entrada de solutos na célula a partir do meio extracelular ou sair solutos da célula indo do meio intracelular para o meio extracelular.

c) **Transporte mediado:** pode ser tanto passivo quanto ativo. Quando for passivo não há o gasto de energia externa ao sistema, pois o soluto se desloca a favor do seu gradiente eletroquímico, do maior para o menor gradiente eletroquímico, no caso de um soluto carregado ou a favor do gradiente de concentração, da maior concentração para a menor, para o caso de um soluto não-carregado. Porém,

por algum motivo (tamanho, natureza polar), a substância encontra na membrana uma barreira ou obstáculo para sua entrada ou saída da célula. Nesse processo entram em ação proteínas estruturais da membrana que "facilitam" a passagem dessas substâncias através da mesma. Estas proteínas são chamadas de carreadoras, e executam a passagem do soluto de um lado da membrana para o outro com gasto de energia, e sendo assim tem-se o transporte mediado.

O aumento de absorção do fármaco é proporcional a dose aplicada, muito embora não exista um transportador específico. A principal fonte de variação neste tipo de transporte é a lipofilicidade da molécula, dada pelo seu coeficiente de partição. O grau de ionização também exerce uma influência neste tipo de transporte, quanto menos ionizáveis os compostos melhor são absorvidos.

Outros tipos de transporte mais raros são de absorção convectiva, de compostos extremamente pequenos (menores que 4 Å de raio), de absorção por par iônico, de sais de amônio quaternário, e por endocitose transporte de moléculas grandes(Thomas, 2003).

Fatores físico-químicos e absorção de compostos

Alguns fatores importantes que determinam a absorção de fármacos são: a solubilidade em água, lipossolubilidade e grau de ionização. Isto também serve para determinar o quanto uma determinada droga irá permanecer no organismo, causando transtornos, ou se esta será excretada.

a) Solubilidade em água

A solubilidade das substâncias é uma propriedade importante para a sua absorção e, conseqüentemente, para a sua atividade, boa ou ruim. Para serem absorvidos, as substâncias devem estar solúveis no meio onde ocorrerá a absorção. Formas farmacêuticas sólidas devem, portanto, se dispersar e o princípio ativo deve ser solúvel no meio, constituído de água, íons, enzimas, bile e outros componentes, dependendo da porção do trato gastrointestinal onde se encontram. Fármacos pobremente solúveis em água não são absorvidos adequadamente, não atingindo concentrações plasmáticas ideais. Do mesmo modo se substâncias tóxicas não forem solúveis em água, estas podem permanecer no organismo presas no tecido adiposo. Por sua vez, fármacos muito hidrossolúveis não atravessam as membranas plasmáticas por difusão passiva, que é o principal processo de absorção. Portanto, é importante que seja determinado o coeficiente de partição

do fármaco, para se ter em conta a sua hidrossolubilidade, e que esta seja apropriada.

Muitos fármacos ionizáveis (ácidos ou bases) são utilizados na terapêutica na forma de sais (mais hidrossolúveis), desta forma há uma melhor dissolução o que resulta em uma maior absorção. Cabe salientar que a velocidade de dispersão da forma farmacêutica e o tamanho das partículas também influenciam na etapa de dissolução do princípio ativo.

b) Lipossolubilidade

A absorção de um determinado composto depende da sua lipossolubilidade, visto que esta propriedade está relacionada com a passagem através das membranas lipídicas. O coeficiente de partição $\log P$ é uma maneira de se determinar a lipo ou hidrossolubilidade de uma substância e prever a sua absorção. Substâncias lipofílicas com um coeficiente de partição intermediário ($0,4 < \log P < 4$) normalmente são mais bem absorvidas. Tendo um coeficiente de partição menor que 0,4 os compostos testados tendem a ser excretadas, por outro lado tendo um coeficiente de partição maior que 4 estas substancias podem ficar presas no tecido adiposo. Este ultimo caso pode determinar a toxicidade de uma determinada molécula.

Para moléculas ácidas ou básicas, sua lipossolubilidade também será influenciada pelo grau de ionização, determinado pela constante de dissociação (pK_a) e pelo pH do meio. Entretanto, o coeficiente de partição não pode ser demasiadamente alto, pois pode dificultar a dissolução dos fármacos nos líquidos do trato gastrointestinal.

c) Coeficiente de partição, $\log P$:

A lipofilicidade é uma das propriedades físico-químicas que mais influencia na capacidade de uma molécula se movimentar através de compartimentos biológicos, esta propriedade está diretamente envolvida em processos farmacocinéticos, tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) bem como nas interações com alvo-ligante. O coeficiente de partição ($\log P$) permite fazer uma estimativa da absorção dos fármacos no organismo, podendo revelar compostos com potencial ação farmacológica. Esta propriedade mede a hidrofobicidade da molécula como um todo, sendo considerado o parâmetro mais importante em estudos de permeação e de relações estrutura atividade. Trata especificamente da razão entre concentrações de uma substância, em condições de equilíbrio, em um sistema bifásico constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa:

$$P = [\text{fase orgânica}] / [\text{fase aquosa}]$$

O sistema preferencial para determinação do coeficiente de partição, P, para emprego em estudos de QSAR/SAR é o sistema 1-octanol : tampão fosfato pH 7,4. Este sistema mimetiza membranas biológicas, tendo uma porção apolar e uma polar.

A razão lipofílico/hidrofílico de um composto é crucial para que este desempenhe eficazmente a sua função no organismo, já que o percurso entre a sua administração e o alvo de atuação dentro da célula envolve tanto meios aquosos como não aquosos. O grau de solubilidade num solvente polar é uma indicação da maior ou menor facilidade com que o composto químico atravessa as membranas biológicas, enquanto a solubilidade na água permite elucidar o seu comportamento tanto no meio extracelular como no citoplasma. Moléculas altamente lipofílicas têm tendência a ficar retidas nos tecidos adiposos, a ligarem-se mais fortemente às proteínas plasmáticas, o que diminui a interação com alvos farmacológicos, e a serem muito pouco solúveis na fase aquosa, o que faz com que não sejam eficazmente distribuídas no organismo. Aquelas muito hidrofílicas podem não ter a capacidade de atravessar membranas,

ficando assim mais susceptíveis a serem rapidamente excretadas sem que ocorra a ação farmacológica desejada.

d) Grau de ionização

Os fármacos são, em geral, ácidos ou bases fracas cujas formas neutra e ionizada, se mantêm em equilíbrio quando em solução. A forma dissolvida e não ionizada de ácidos ou bases é absorvida preferencialmente, isso porque ela é mais lipofílica. A absorção por difusão através das membranas neste caso depende do coeficiente de partição do fármaco. (Jambhekar, 1995; Block, 1998)

A maioria dos fármacos se apresenta como ácidos e bases fracas e por isso os valores de pK_a e o pH dos compartimentos onde se encontram serão muito importantes para sua absorção, pois isto determinará o grau de ionização do fármaco naquele compartimento. Os compartimentos do trato gastrointestinal onde ocorre a absorção são o estômago (menor proporção) e intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo).

Alguns pHs dos fluidos biológicos:

- Estômago: 1 a 3,5 (noite: 1,3)
- Duodeno: 5 a 7
- Jejuno, íleo: 7 a 8

- Fluidos circulantes: 7,4 (plasma e fluido cerebrospinal)

Normalmente, a maioria dos fármacos são absorvidos no intestino. No entanto, os ácidos fracos e substâncias neutras podem ser absorvidos, em determinada proporção, no estômago. O tempo de permanência do fármaco e a presença de alimento nos compartimentos do trato gastrointestinal também influenciam a absorção.

Enquanto alguns compostos (fenóis e ácidos carboxílicos) agem na forma molecular, outros (sulfonamidas, sais de amônio quaternário, acetilcolina) o fazem na forma ionizada. Portanto, o pH desempenha importante papel na atividade biológica.

PERMEABILIDADE EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)

O ensaio de permeabilidade por meio do modelo de Membrana Artificial Paralela (“Parallel Artificial Membrane Permeability Assay”-PAMPA), proposto inicialmente por Kansy e colaboradores (Kansy, Senner e Gubernator, 1998; Kansy *et al.*, 2001) tem atraído a atenção de pesquisadores que estudam a absorção passiva transcelular de fármacos pela via oral (Kansy *et al.*, 2001;

Lipinski *et al.*, 2001). A técnica é capaz de prever não apenas a partição água/membrana, mas também sua solubilidade e estado de carga em diferentes valores de pH.

No ensaio de PAMPA um “sanduiche” é formado por duas placas de 96 poços, sendo que a placa superior, denominada de compartimento doador, onde as substancias a serem avaliadas são diluídas numa solução tampão. A placa inferior compõe o compartimento acceptor, e apresenta membranas sintéticas impregnadas com solução lipídica de fosfatidilcolina, formando uma barreira através da qual os fármacos migram. A solução acceptora contém uma solução de mesma composição que a solução doadora.

Condições gerais do ensaio de PAMPA

Alguns parâmetros devem ser levados em consideração nos ensaio do PAMPA, pois eles afetam os resultados de permeação dos compostos testados. Dentre os parâmetros a serem avaliados estão a composição da membrana artificial, pH e composição do meio dos compartimentos doador e acceptor, e presença ou ausência de agitação das placas, este último está relacionado ao efeito da camada de água estacionária (CAE).

- composição da membrana artificial: é composto principalmente por um filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) hidrofóbico impregnado com mistura lipídica dissolvida em um determinado solvente orgânico. Em relação a composição lipídica da membrana, geralmente é utilizado um solvente polar a fim de dissolver o fosfolípido antes do revestimento do filtro, visto que os fosfolípidos são sólidos que não dispersam em filtros.

- pH e composição dos meios dos compartimentos doador e receptor: com a intenção de mimetizar os fluidos sanguíneo e intestinal, são utilizados diferentes reagentes na preparação das soluções que compõem os compartimentos receptor e doador. No entanto, o fosfato é o meio mais utilizado para o ensaio de PAMPA. Para uma melhor avaliação de compostos pouco solúveis também é possível a utilização de co-solventes ou ácidos biliares (Sugano *et al.*, 2001; Avdeef, 2012). O uso de DMSO como co-solvente tem sido para muitos autores uma boa alternativa para aumentar a solubilidade de compostos altamente lipofílicos.

O pH do compartimento receptor geralmente é 7,4 (pH fisiológico), enquanto no doador pode variar (4,5 – 8), simulando o pH de diferentes segmentos do trato intestinal (Lennernäs, 1998; Avdeef, 2012). Compostos ionizáveis

possuem uma maior capacidade de difundir através das membranas biológicas, principalmente na forma não ionizadas. Sendo assim, a extensão da absorção de compostos através da membrana depende do seu grau de ionização.

- agitação das placas e o efeito da Camada de Água Estacionária (CAE): pode ser descrito como uma camada de água, muco ou glicocalix mais ou menos estático, adjacente a parede intestinal, e é criada pela mistura incompleta do conteúdo luminal próximo a superfície da mucosa intestinal e pode funcionar como barreira de absorção (Hogben *et al.*, 1959; Brasitus e Schachter, 1984). Alguns pesquisadores na tentativa de reduzir a espessura da CAE (1362 μ) utilizam agitadores magnéticos capazes de realizar uma rotação magnética individual nos diferentes poços de uma microplaca, reduzindo desta forma a camada de água estacionaria para até 13 μ em alguns casos (Wohnsland e Faller, 2001; Avdeef, Nielsen e Tsinman, 2004). Apesar da ampla importância da CAE, descrita na literatura (Avdeef, 2012), muitos trabalhos tem sido publicados com bons resultados sem levar em conta o efeito da CAE (Sugano *et al.*, 2001).

ALCALOIDES PIRROLIZIDINICOS NA DIETA HUMANA

Os alcalóides pirrolizidínicos (APs) são compostos tóxicos sintetizados em geral para a defesa de plantas, são provavelmente, as toxinas naturais mais amplamente distribuídas que afetam a vida selvagem, os animais e os seres humanos. Estima-se que mais de 6.000 espécies de plantas produzam estes compostos (Stegelmeyer *et al.*, 1999; Roeder, 2000). As maiores concentrações de toxinas geralmente estão localizadas nas sementes e as partes floração das plantas e as principais fontes são as famílias da Boraginaceae (todos os gêneros), Asteraceae (tribos Senecioneae e Eupatorieae) e Fabaceae (gênero *Crotalaria*) (Coulombe Jr, 2003).

Os efeitos e/ou impactos de APs variam desde a toxicidade aguda à genotoxicidade. Os APs 1,2-insaturados podem ser metabolizados no fígado para gerar intermediários reativos tóxicos também chamados "pirróis reativos" (Martinello *et al.*, 2014). Estas substâncias são fortes eletrófilos que podem reagir com bases nucleofílicas de DNA, e também com os aminoácidos e as proteínas, provocando diferentes tipos de efeitos tóxicos. Nos seres humanos, o envenenamento está associado com a doença veno-oclusiva hepática aguda (DOVH), com hepatomegalia, ascite e derrame pleural. (Ridker, 1985)

A doença aguda causada por envenenamento por alcalóides pirrolizidínicos pode causar alta mortalidade enquanto um início sub-aguda ou crônica pode levar à cirrose hepática. Em diferentes modelos animais os APs induziram a mutações no DNA (Frei *et al.*, 1992), a carcinogenicidade (Chen, Mei e Fu, 2010) e teratogenicidade (Roeder, 1995). Com base no conhecimento atual dos estudos de metabolismo, ativação, e formação de aductos de DNA, de genotoxicidade e de carcinogenicidade, o Painel da AESA de Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) (Efsa, 2011) aponta que APs 1,2- insaturados podem agir como cancerígenos em humanos, e sendo assim tornam se restrito seu consumo em alimentos.

Os relatórios sobre a toxicidade potencial destas substâncias foram publicados a partir de 1954 por Shoental L. (Schoental, Head e Peacock, 1954) e, posteriormente, vários autores relataram casos humanos de envenenamento após o consumo de alimentos contaminados com sementes ou ervas que contenham APs no Afeganistão (Mohabbat *et al.*, 1976), China (Kumana *et al.*, 1983), EUA (Stillman *et al.*, 1977), e na Índia (Tandon *et al.*, 1976). Em 1988, o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) relatou as patologias da epidemia causada pelo consumo de alimentos contaminados com APs e pediu a colaboração

entre as nações para uma melhor compreensão do problema para iniciar um processo de regulação para estabelecer os limites de exposição e programas de pesquisa (Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) (Safety, 1988; Safety., 1989a; Safety, 1989b). Recentemente, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) foi convidada pela Comissão Europeia para entregar um parecer científico sobre alcalóides pirrolizidínicos na alimentação humana (Efsa, 2011; Martinello *et al.*, 2014). Em novembro de 2011 foi determinado que a quantidade limite de consumo destas substâncias em produtos fitoterápicos não deveria exceder a 1 µg/dia, muito embora para produtos produzidos por abelhas (mel, própolis, geleia real) estes limites ainda não foram revisados. (Kempf *et al.*, 2010)

Em se tratando de mel, este produto goza da reputação de ser um produto natural e saudável, e é consumido puro e usado como um ingrediente em frutas, cereais matinais, doces, produtos de panificação, cosméticos e para fins medicinais. A Comunidade Europeia importa cerca de 130.000 toneladas de mel por ano, com um valor de mais de € 200 milhões de países não-europeus, o que dá um destaque especial para este produto. No entanto, até a momento pouco se sabe das quantidades limites dos alcalóides no mel, o que se pode

confirmar é que estes compostos, considerados tóxicos estão presentes em quase todos os tipos de mel encontrados no mercado. (Dübecke, Beckh e Lüllmann, 2011)

Como consequência deste fato, uma grande variedade de procedimentos de extração e concentração, bem como os métodos de análises, tem sido desenvolvida ao longo dos anos para a determinação dos alcalóides pirrolizidínicos em produtos alimentícios. (Kempf *et al.*, 2010).

3.Objetivos

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar as propriedades físico-químicas envolvidas nos processos ADMET dos alcalóides isolados a partir da espécie *Senecio brasiliensis*. Além disto, foram analisadas amostras de mel do comercio local a fim de se detectar a presença dos alcalóides pirrolizidínicos senecionina e N-oxido senecionina, visto que a espécie estudada possui uma característica melífera, sendo bastante apreciada por abelhas.

Objetivos Específicos

1. Fazer a coleta da espécie *Senecio brasiliensis* e obter os extratos brutos;
2. Efetuar um *screening* dos extratos brutos das flores, folhas e caules da planta, com o auxílio da técnica de eletroforese capilar utilizando diferentes condições, para determinar compostos presentes na planta;
3. Através da eletroforese capilar, identificar em que parte da planta se encontra a maior concentração de compostos;
4. Isolar e caracterizar os compostos a partir da espécie estudada
5. Determinar o pKa e a mobilidade iônica dos alcalóides isolados a partir de espécie estudada;

6. Quantificar os alcalóides isolados na flor e folha *in natura* da espécie
7. Determinar alguns os parâmetros físico-químicos tais como log P, permeabilidade em membrana (PAMPA), pKa e interação com proteína relacionados ao processo ADMET com auxílio da eletroforese capilar dos alcaloides presentes na espécie.
8. Avaliar as concentrações dos compostos dos diferentes reservatórios utilizados no estudo de permeabilidade em membrana (PAMPA) por eletroforese capilar
9. Determinar e quantificar alcalóides em amostras de mel por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

4. Resultados e Discussões

A ELETROFORESE CAPILAR COMO GUIA NO ISOLAMENTO FITOQUÍMICO

A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração de compostos iônicos, ionizáveis e neutros sob a influência de um campo elétrico. A mobilidade efetiva pode ser definida pela equação 1

Equação 1: Determinação da mobilidade efetiva

$$\mu_{eff} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_j$$

Onde, μ_j é a mobilidade eletroforética de cada n espécies que estão relacionadas entre si por equilíbrio químico, que é multiplicado por α_j , que representa a distribuição destas espécies em um intervalo de pH

Dependendo do pH da solução do eletrólito de corrida, o analito pode ter carga positiva ou neutra (Poole, 2004). Assim, explorando as condições analíticas, podemos obter condições seletivas para uma determinada classe de compostos, levando em consideração o fluxo eletroosmótico. O fluxo eletro osmótico tem sua origem na atuação do campo elétrico sobre as espécies carregadas

na região difusa da dupla camada formada pela parede interna do capilar (Silva, 2007).

Como esperado, o fluxo catódico está presente em baixo valores de $\text{pH} > 3$, e aumenta sigmoidalmente conforme o aumento do pH , aumenta o potencial zeta. Esta relação direta reflete na ionização da parede interna capilar. Portanto, o fluxo que está presente em $\text{pH} < 5$ é relativamente baixo. E se uma mistura de compostos for introduzida neste fluxo, somente compostos de caráter catiônico, como alcalóides, serão detectados. Por outro lado, o fluxo é maior em $\text{pH} > 9$, e assim o fluxo é capaz de conduzir ao detector compostos aniônicos. Sob estas condições, é possível efetuar as análises de flavonóides e compostos fenólicos (ânions). Em pH intermediário, valores próximos a 6, os flavonóides são esperados como tendo carga próxima a zero, e sendo assim apenas os compostos fenólicos podem ser ionizados e detectados. Estas condições podem apresentar uma ferramenta poderosa para uma avaliação preliminar de uma mistura complexa. Neste sentido, a eletroforese pode servir como guia no isolamento de compostos, auxiliando na investigação fitoquímica, levando a determinação direta em que parte da planta (flores, folha e caule) tem maior potencial para isolamento de bioativos de forma altamente

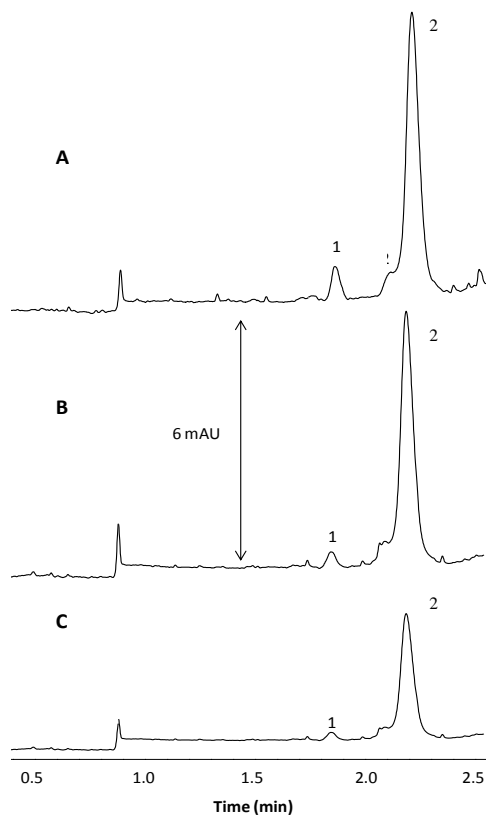
eficiente. Neste contexto, o presente trabalho com o auxílio da eletroforese capilar, usando diferentes condições eletroforéticas, buscou efetuar um *screening* nos extratos brutos de diferentes partes da planta para determinar qual delas seria potencialmente interessante para o isolamento de compostos.

Determinação dos alcalóides

A mobilidade do FEO é mínima em pH baixo devido a redução do potencial zeta na parede capilar. A determinação dos alcalóides foi efetuada sob estas condições de pH baixo, com o BGE (Background electrolyte) preparado em pH 3,5. Sob estas condições, os analitos são protonados, e o fluxo não é alto o bastante para que compostos aniônicos alcancem o detector em poucos minutos (sob FEO normal em que a direção é do eletrodo positivo para o negativo). Sendo assim, somente compostos catiônicos são esperados alcançar o detector com pequeno tempo de análise, fazendo o método ainda mais seletivo. Além disso, o uso do DAD em detecção direta torna possível a diminuição de interferentes (cátion inorgânicos, aminas alifáticas e aminoácidos) (Costa, 2007).

A solução estoque de cada extrato bruto foi injetada no equipamento de eletroforese capilar e os eletroferogramas são mostrados na Figura 9.

Figura 9: Eletroferogramas dos extratos brutos da planta sob as mesmas condições: (A) flores; (B) folhas; e (C) caules,



Legenda: Composição do eletrólito: BGE composto por 20 mM de β -alanina, 10 mM de ácido perclórico e 60 mM de HP- β -CD, em pH 3.5. Condições Analíticas: capilar de sílica fundida, $L_t = 48.5$ cm, $L_{det} = 8.5$ cm, 50 μ m id; 375 μ m o.d, 50 mbar/ 5s

injeção hidrodinâmica; 25 °C; 20 kV de voltagem aplicada e polaridade positiva; detecção direta em 200 nm. Tempo total de análise 3.0 min.

Como mostra a Figura 9, todas as partes da planta apresentam perfil similar sob as mesmas condições experimentais, mas há diferenças entre elas em termos de concentrações dos compostos detectados (picos 1 e 2). Neste estágio do trabalho os resultados guiaram no processo de isolamento de alcalóides. E baseado nas concentrações dos compostos em cada parte da planta, foi então escolhido somente o extrato bruto da flor para o processo de isolamento dos compostos detectados. Muito embora as concentrações dos alcaloides na flor e folha sejam semelhantes, a quantidade de extrato produzido é menor, e sendo o objetivo o isolamento de compostos em quantidades suficientes para os demais estudos, a flor se mostrou mais interessante para a produção do extrato bruto para o isolamento.

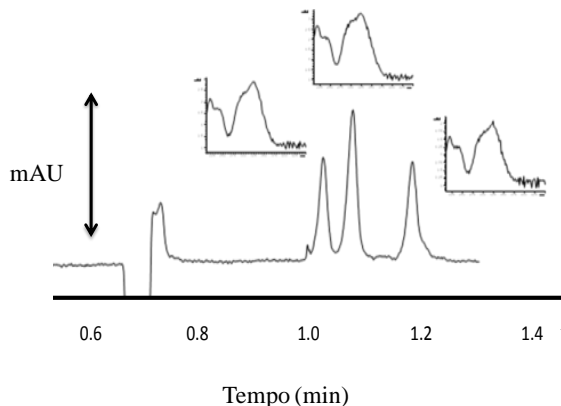
A presença de alcalóides pirrolizidínicos neste gênero já tem sido bastante descrita na literatura (Hoesch *et al.*, 1996; Krebs, Carl e Habermehl, 1996; Mandic *et al.*, 2009), o qual faz com que estas macroestruturas sejam os marcadores taxonômicos do gênero *Senecio*.

Determinação de compostos fenólicos

Usando um sistema de pH neutro, os compostos fenólicos se encontram em sua maioria na forma aniônica, e o FEO é alto o suficiente para carrear os ácidos até o detector. Ao manter o pH em condições ligeiramente ácidas (aproximadamente 6,5), outras espécies aniônicas tais como flavonóides permanecem predominantemente em sua forma neutra, o que torna as corridas eletroforéticas mais seletivas para compostos fenólicos do tipo ácidos fenólicos. A Figura 10 mostra um eletroferograma do extrato bruto da flor e o espectro de UV obtido através do método para determinar compostos fenólicos, onde em um pH em torno de 6 é possível se observar a presença de ácidos fenólicos.

Com base no espectro de UV observado no eletroferograma da Figura 10, pode se atribuir a presença de ácido fenólicos no extrato bruto da planta. Este dado até a presente data é inédito na literatura da espécie *Senecio brasiliensis*.

Figura 10: Eletroferogramas dos compostos fenólicos presente no extrato bruto das flores da espécie *Senecio brasiliensis*. Somente a amostra



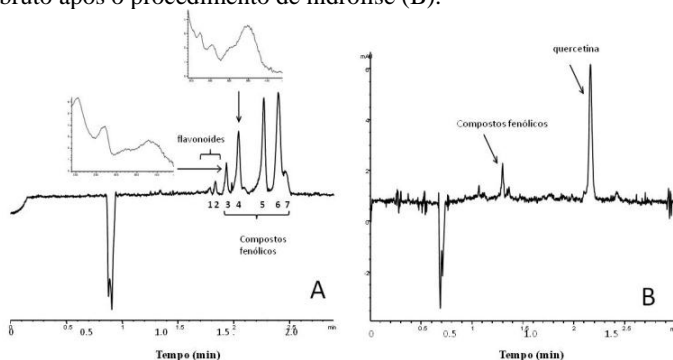
Composição do Eletrólito: 20 mM de TRIS e 40 mM de MES tamponado em pH 6,5. Condições Analíticas: capilar de sílica fundida, $L_t = 48,5$ cm, $L_{det} = 8,5$ cm 50 μ m id; e 375 μ m o.d, 50 mbar/ 5s com polaridade positiva na injeção e temperatura do cartucho foi mantida em 25°C, a voltagem aplicada foi de 25 kV; detecção direta em 323 nm. Tempo total de análise, 1.5 min

O método usado permitiu visualizar três picos sugerindo a presença de compostos fenólicos, contendo grupo carboxílico ($pK_a < 7,5$) em menos de 1.5 min. A investigação de seus espectros e seu comportamento eletroforético sugere que estes compostos fenólicos possuem estrutura química similar, a qual corresponde a estrutura de ácidos cafeoilquínico.

Determinação de flavonóides

O FEO é maior em valores de pH maior que 9, e a presença de flavonóides pode ser determinada devido a essas estruturas estarem totalmente ionizadas sob estas condições. De acordo com a Figura 11 pelo menos sete compostos diferentes estão presentes, mas podemos notar que os compostos fenólicos nestas condições também estão ionizados e foram detectados. O espectro de UV da figura 11 mostrou que os picos (I, II e III) presentes na eletroferogramas são similares entre si, e são típicos de espectros de flavonóides do tipo o-glicosideo. Em contraste, os picos IV, V e VI exibiram espectro de UV característicos de compostos fenólicos (como visto na Figura 10). O que é de se esperar, visto que em pH 9 todos os compostos fenólicos incluindo ácido fenólicos estão ionizados, e desta forma podemos observar a presença de todos.

Figura 11: Eletroferograma obtido do extrato bruto das flores da espécie *Senecio brasiliensis*, em pH = 9 e 350 nm, (A) extrato bruto após o procedimento de hidrólise (B).



Legenda: Composição do Eletrólito: 20 mM de TBS e metanol 20% (v/v) tamponado em pH 9,3. Condições Analíticas: capilar de sílica fundida, $L_t = 48.5$ cm, $L_{det} = 8.5$ cm, 50 μ m id e 375 μ m o.d.; 50 mbar/ 5s com polaridade positiva injeção hidrodinâmica; 25 $^{\circ}$ C; voltagem aplicada de 30 kV; detecção direta em 360 nm. Tempo total de análise, 5 min.

O tetraborato de sódio (TBS) é comumente usado na composição do BGE para análises de flavonóides em EC. Este eletrólito tem a capacidade de formar complexos com hidroxilas vicinais de muitos compostos, aumentando a seletividade do método. A especificidade do método é maximizada quando se analisam em comprimento de onda maior que 350 nm para a detecção. Se os flavonóides glicosilados são O-glicosídeos, então estes são passíveis de ser determinados após a hidrólise. Para este fim, foi realizado o procedimento de hidrólise do extrato e somente foi observada a presença de uma aglicona, correspondente

a quercetina. Este dado pode ser observado na Figura 11B. Desta forma, foi possível identificar que todos os flavonóides presentes no extrato da planta são o-glicosídeos da quercetina. Cabe salientar que não foi detectada a quercetina livre no extrato bruto não hidrolisado.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

Baseado nos dados apresentados pela técnica de eletroforese capilar, onde foi dado o direcionamento para o isolamento de compostos a partir do extrato bruto da flor, foi possível isolar dois compostos alcaloídicos de interesse para a pesquisa de propriedades físico-químicas envolvidas no processo ADMET. Além dos compostos alcaloídicos, o estudo eletroforético auxiliando como ferramenta de *screening* fitoquímico, também demonstrou a presença de flavonóides glicosilados e de ácidos cafeoilquínico presentes no extrato bruto da espécie *Senecio brasiliensis*.

Isolamento dos compostos

Posteriormente, o extrato bruto foi submetido a processo de extração líquido-líquido, as frações foram

concentradas e cromatografadas, para então se obter a partir de dois processos de extração as frações: rica em alcaloides, a fração acetato de etila e aquosa.

O primeiro processo de extração, baseado nos dados eletroforéticos, levou a um processo de extração ácido base originando dois compostos alcaloídicos. O segundo processo separação líquido-líquido originando as frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa. Destas frações apenas a acetato de etila foi submetida à separação cromatográfica, originando uma mistura de ácidos cafeoilquínico. Os flavonóides glicosilados permaneceram na fração aquosa.

No entanto, não sendo o foco de estudo deste trabalho os compostos fenólicos, estes não foram isolados e caracterizados por RMN, IV. Sendo identificados por HPLC/MS/MS.

Após o isolamento os compostos foram submetidos a análises de elucidação estrutural. Como em todo processo de separação as primeiras análises são as características físicas.

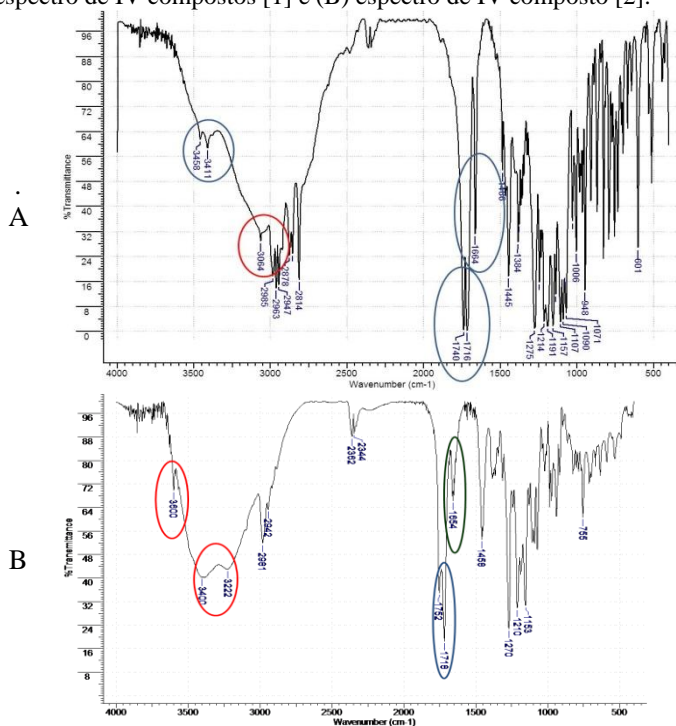
Primeiramente os compostos isolados com auxílio de cromatografia em coluna usando um sistema de solvente isocrático de metanol, cloroformio e hidróxido de amônio (85:14:1), deste processo foram isolados dois compostos nomeados [1] e [2]. Após o isolamento os

compostos foram submetidos à análise de ponto de fusão. Os dois compostos isolados apresentaram ponto de fusão na faixa entre 167 e 170. Em se tratando de aspecto morfológico, o composto [1] apresenta-se como sólido branco cristalino. Enquanto o composto [2] possui característica mais amorfa, sendo um sólido de coloração branca pálida. Na análise em cromatografia de camada delgada usando eluente MeOH:CHCl₃:NH₄OH usando o mesmo sistema utilizado na separação em coluna e dragendorff como revelador. O composto [1] apresenta R_f de 0,87, bem diferente do composto [2] que apresenta R_f de 0,32, ou seja, na CCD o composto [2] aparece sendo bem mais polar que o composto [1].

Análise de espectroscopia de infravermelho Infravermelho

Os espectros de infravermelho apresentaram - se bastante diferentes embora, com bandas bem características de grupos OH e C=O em ambos os espectros.

Figura 12 Análise de espectroscopia de infravermelho. (A) espectro de IV compostos [1] e (B) espectro de IV composto [2].



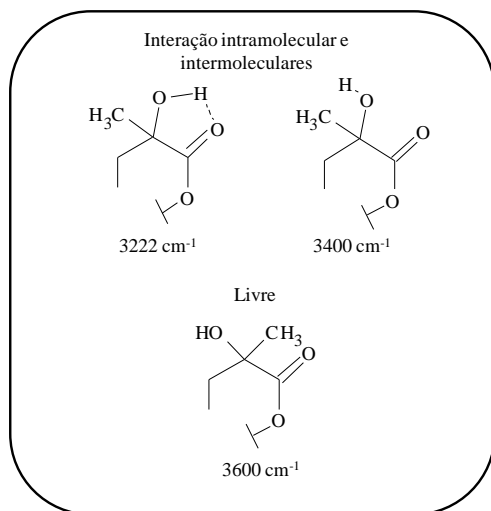
A Figura 12 mostra os espectros de infravermelho dos compostos [1] e [2] isolados. O espectro (A) corresponde aos estiramentos das ligações dos átomos presentes na estrutura do composto [1]. Pode-se observar na região de 3400 cm^{-1} bandas fracas e largas referente ao estiramento de grupamentos OH, e uma banda de fraca intensidade na região de 3060 cm^{-1} , referente a ligações CH olefínicas.

Apresenta ainda bandas finas de forte intensidade na região de 2980 a 2800 cm^{-1} referentes a grupos alifáticos CH_3 e CH_2 . Na região de 1740 cm^{-1} apresenta banda de forte intensidade referente a banda de carbonila de lactona α,β -insaturada em 1716 cm^{-1} e em 1640 cm^{-1} banda de forte intensidade referente a estiramento de carbono característica de carbono sp^2 ($\text{C}=\text{C}$), em regiões que compreendem entre 1070 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} bandas característica de carbono ligados a oxigênio ($\text{O}-\text{C}$), confirmando a presença de grupamento ésteres ou lactonas na molécula, ou éteres ou alcoóis.

Já para o espectro (B) podemos observar diferenças bem definidas como, por exemplo, na faixa que compreende deformações de grupos OH, onde diferentemente do alcalóide [1], as bandas de OH são bastante intensas e largas. Indicando a presença acentuada de grupos OH associados. O que se pode supor a presença de diferentes conformações da molécula [2], visto que o grupo OH pode apresentar ligações intramoleculares entre o hidrogênio da hidroxila com o oxigênio da carbonila, formando pseudo ligações entre esses dois átomos (3222 cm^{-1}), ou de outra forma o grupo hidroxila pode estar em livre rotação nenhuma interação com os demais átomos da molécula apresentando assim banda de intensidade moderada em 3400 cm^{-1} e uma banda de fraca intensidade

em 3600 (Figura 13) . Podemos ainda observar as bandas finas de forte intensidade em 1750 e 1718 cm^{-1} referente ao lactonas α,β -insaturadas. Bandas estas, características de grupos ésteres da lactona, como já foi dito no parágrafo anterior. Além destas, bandas na região de 1070 a 1300 cm^{-1} referentes a estiramentos C-O da função lactona.

Figura 13: Conformação do grupo OH na molécula



Análises de CG/MS dos compostos isolados

Com a finalidade de contribuir na elucidação dos alcalóides, foi efetuado análises de CG/MS. No entanto,

esta técnica apenas colaborou para determinar o padrão de fragmentação dos alcalóides isolados. Ambos os alcalóides apresentaram o mesmo padrão de fragmentação. Muito embora tenham sido separados por outras técnicas, a técnica de cromatografia gasosa não serviu para diferenciar os alcalóides em função de m/z . A estrutura completa do N-óxido não pode ser observada, porque este sofre decomposição térmica quando exposto a temperaturas extremas.

O perfil de fragmentação dos alcalóides é muito semelhante, sendo a primeira quebra entre os átomos C7-O e C11-O gerando os fragmentos de razão m/z de 136 (pico base) e 199. (Figura 14) a segunda quebra mais significativa no cromatograma refere-se a quebra entre os átomos C7-O e C9-O gerando os fragmentos de razão m/z de 120 (89%). A terceira quebra observada na estrutura dos alcalóides aparece entre os átomos C13-C14 e C9-O gerando o fragmento de razão m/z de 220 (33%). Os últimos dois fragmentos de razão m/z de 109 (17%) e 246 (11%) são referentes a quebra entre os átomos C7-O e C9-C1 e C12-C13 e C9-O, respectivamente. O padrão de fragmentação dos alcalóides segue na Tabela 2.

Figura 14 Espectro do perfil de fragmentação dos alcalóides

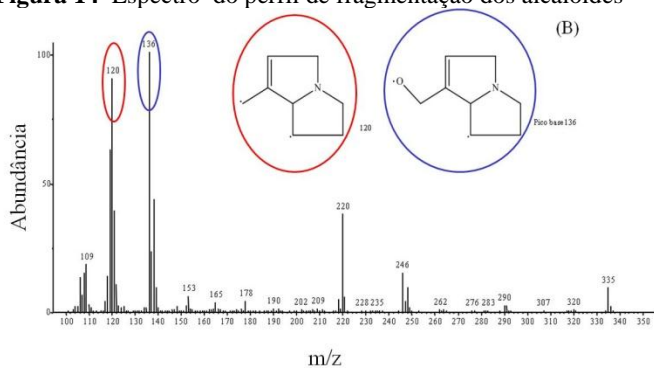
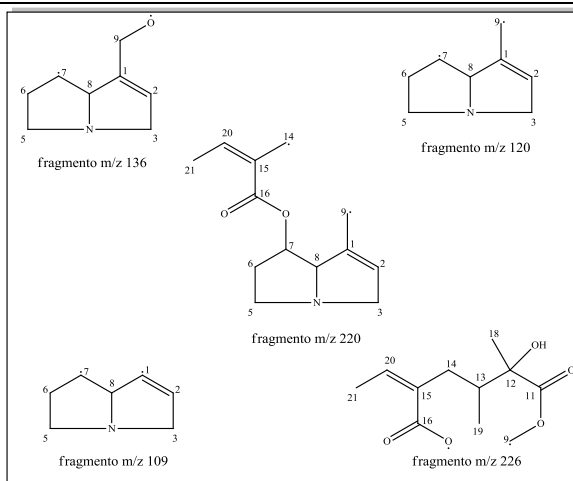


Tabela 1: Fragmentações características dos alcalóides pirrolizidínicos



Composto	Fragmentos
Senecionina [1]	[M-1] 335, 136 (100), 120 (89), 220 (33), 109 (17), 246 (11)
N-oxido Senecionina [2]	[M-1] 335, 136 (100), 120 (89), 220 (33), 109 (16), 246 (11)

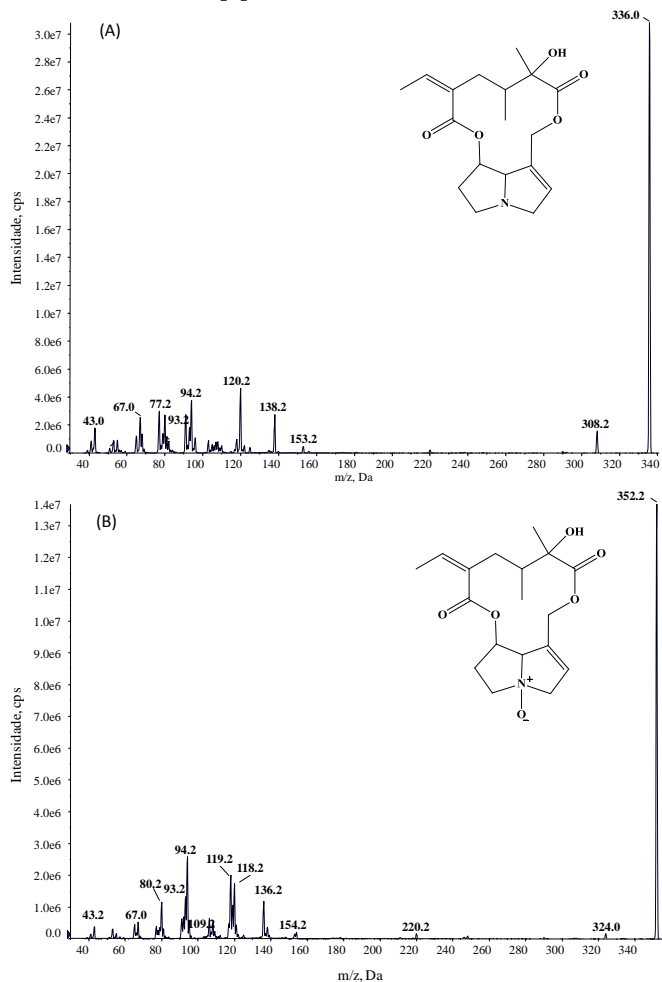
Identificação dos compostos isolados por HPLC-DAD-MS/MS

Após os resultados obtidos com auxílio da técnica de eletroforese capilar, onde apontou a presença de alcalóides, e de compostos fenólicos do tipo flavonóides e ácidos cafeoilquínicos. A identificação destes compostos foi realizada por métodos cromatográficos e por análise de espectrometria de massa (LC/MS/MS e CG/MS) e por ressonância magnética nuclear de ^{13}C , ^1H , DEPT e técnicas bidimensionais (HMQC e HMBC).

a) Confirmação dos alcalóides

Três diferentes compostos foram isolados da fração rica em alcalóides. Estes compostos foram solubilizados em uma mistura MeOH:água (1:1, v/v) e infundido diretamente no espectrômetro de massas (MS). A Figura 15 mostra os espectros de massa obtidos. Com base nos valores dos íons *quasi* molecular $\text{M}+\text{H}^+ 336$ e $\text{M}+\text{H}^+ 352$, foi possível inferir que os compostos analisados são alcalóides pirrolizidínicos senecionina [1] e N-óxido senecionina [2]. Estes dados conferem com dados descritos na literatura (Conradie, Stewart e Steenkamp, 2005).

Figura 15: Espectro de massa dos compostos presentes na espécie *Senecio brasiliensis*. (A) senecionina [1] e (B) senecionina N-óxido [2].



b) Confirmação dos flavonóides

A fração aquosa obtida a partir da extração líquido-líquido foi injetada no sistema HPLC-DAD-MS/MS. Foi possível detectar a presença dos ácidos cafeoilquínicos, mas principalmente de flavonóides glicosilados. Esta identificação foi efetua com base no espectro de massa obtido (Figura 15). O valor dos íons quasi molecular $[M+H^+]$, $[MS+H^+]$ foram de m/z 611 (quercetina-*O*-rutosideo) e m/z 464 (quercetina-*O*-glucosideo), com íon fragmento de m/z 303.

Figura 16: Perfil cromatográfico da fração aquosa (A) e espectro de massa da quercetina-*O*-rutosideo [7] (B) e quercetina-*O*-glucosideo [8] (C) presente na espécie *Senecio brasiliensis*.

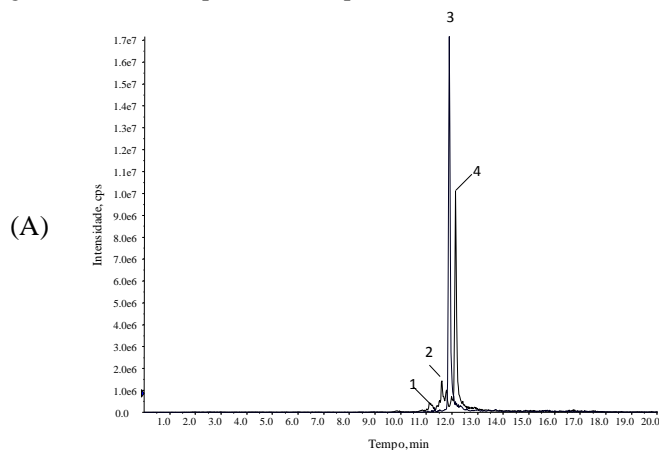
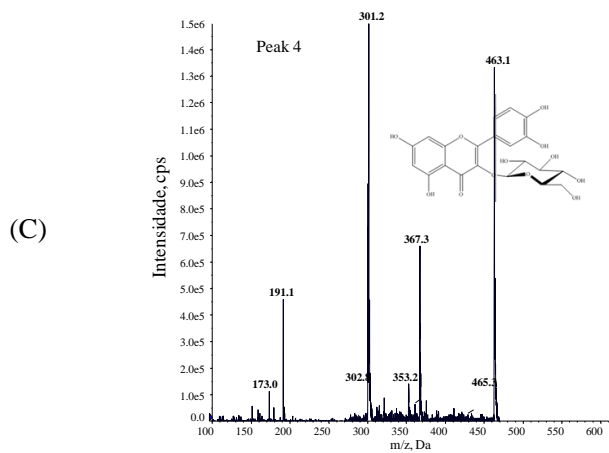
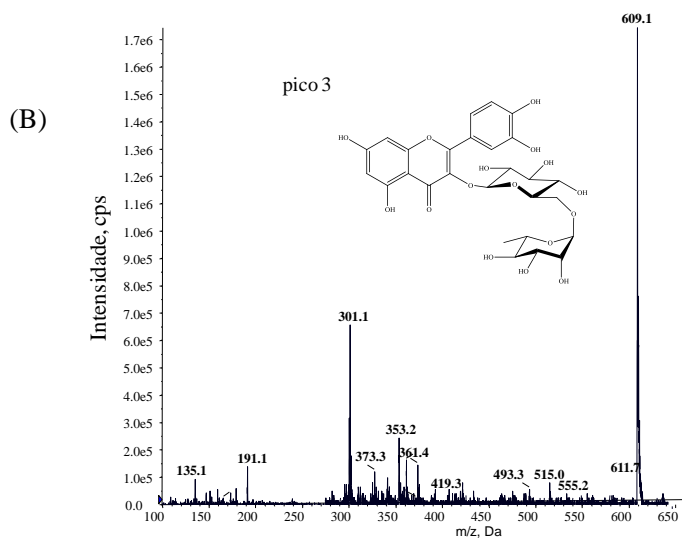


Figura 16 continuação



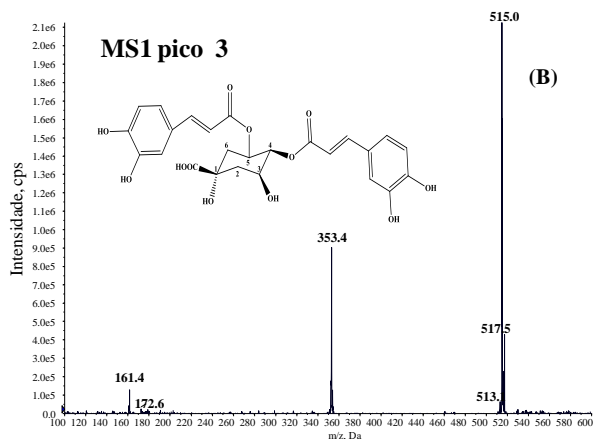
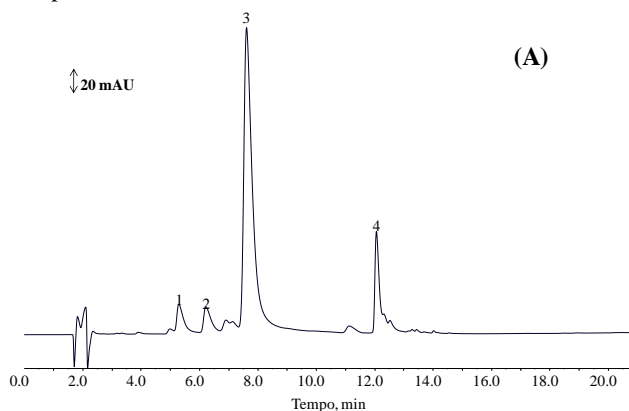
b) Confirmação dos ácidos cafeoilquínicos

Com base nos dados obtidos usando eletroforese capilar, foi possível concluir que a espécie *Senecio brasiliensis* podem conter ácidos cafeoilquínicos em sua composição fitoquímica (Figura10). Estes compostos, que foram detectados com o auxílio da eletroforese capilar, foram posteriormente caracterizados usando HPLC/DAD/MS/MS (Clifford, 2005). A Figura 16 (pag 55) apresenta os cromatogramas obtidos em 360 nm. Para identificar os isômeros dos ácidos cafeoilquínicos foram conduzidos três experimentos modo MS: MS1, MS2, e MS3.

Podemos observar que o valor m/z obtido para todos os picos de maior intensidade no experimento MS1 foram m/z 515, o que indica que os picos são referentes a dicafeoilquínicos (Tabela 2). A caracterização dos compostos no modo MS2 e MS3 foram efetuadas conforme procedimento “hierarchical key” propostos por Clifford (Clifford, 2005). O experimento MS3 foi realizado usando híbrido triplo quadrupolo-ion trap. Com base nos espectros de massa obtidos e usando o procedimento “hierarchical key” (Tabela 1), foi possível identificar os quatro compostos mais abundantes no extrato

como sendo os ácidos 3,5-dicafeoilquínico (1), 3,4-dicafeoilquínico (2), 4,5-dicafeoilquínico (3), e 1,4-dicafeoilquínico (4) (Figure 17A).

Figura 17: Perfil cromatográfico dos ácidos cafeoilquínicos por HPLC-DAD (A). Procedimento “hierarchical key”. Espectro de massa por HPLC-MS/MS para MS1 (B), MS3 (C) e MS2 (D) do composto majoritário ácido 4,5-dicafeoilquínico (3) presente na espécie *Senecio brasiliensis*.



Continuação Figura 17

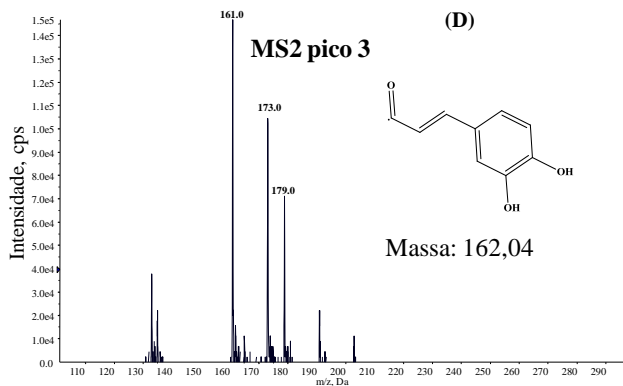
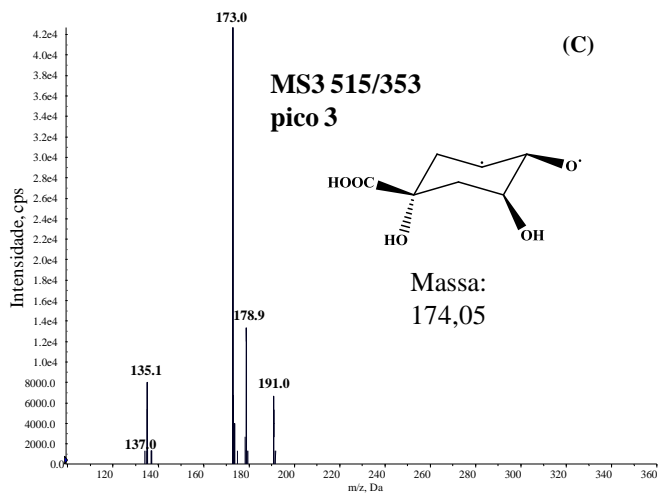


Tabela 2: Identificação de ácidos cafeoilquínicos utilizando o método “Hierarchical key” por LC-MS (Clifford, 2005).

	Critérios	Identificação	Ação
1	Íon precursor m/z 337	Ác. p-coumaroilquínico	<i>Passe</i> <i>ref (5)</i>
	Íon precursor m/z 353	Ác. cafeoilquínico	<i>Passe (2)</i>
	Íon precursor 367	Ácido feruloilquínico	<i>Passe</i> <i>Ref (5)</i>
	Íon precursor m/z 515	Ácido dicafeoilquínico	<i>Passe (3)</i>
	Íon precursor m/z 529	Ácido cafeoil feruloilquínico	<i>Passe ref (5)</i>
2	MS ² pico base m/z 191, relativamente intenso (ca 50% pico base) MS ² íon em m/z 179	Ác. 3-cafeoilquínico (II)	
	MS ² pico base m/z 173	Ác. 4-cafeoilquínico (IV)	
	MS ² pico base m/z 191, fraco ou indetectável (<5% pico base) MS ² íon em m/z 179	Ác. 5-cafeoilquínico (III) ou 1-ác. cafeoilquínico (I)	Distinguir por TR na coluna de fase reversa
3	MS ³ pico base m/z 173	Ác. 4-acil dicafeoilquínico	<i>Passe 4</i>
	MS ³ pico base m/z 191	Ác. dicafeoilquínico não substituído na posição 4	<i>Passe 5</i>
4	Forte (>50% pico base) MS ¹ ions em m/z 299 e m/z 203	Ác. 1,4-dicafeoilquínico (VI)	
	Fraco (ca 15%) MS ¹ íon em 335 e forte (>50% pico base) MS ² íon em m/z 179	Ác. 3,4-dicafeoilquínico (VIII)	

Tabela 2 continuação

5	MS ¹ ion em <i>m/z</i> 335	
	indetectável, forte (>50% pico base) MS ² ion em <i>m/z</i> 179	Ác. 4,5-dicafeoilquinico (X)
	MS ¹ ion em <i>m/z</i> 335(>30% pico base) e forte (>50% pico base) MS ² ion em <i>m/z</i> 179	Ác. 1,3-dicafeoilquinico (V)
	Fraco MS ¹ ion <i>m/z</i> 335 (<10% pico base) e fraco MS ² ion em <i>m/z</i> 179 (<10% pico base)	Ác. 1,5-dicafeoilquinico (VII)
	MS ¹ ion em <i>m/z</i> 335 indetectável, forte (<50% pico base) MS ² ion em <i>m/z</i> 179	Ác. 3,5-dicafeoilquinico (IX)

Análises de RMN dos compostos isolados

Através dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135 e ATP (anexos) e com o auxílio das técnicas bidimensionais HMQC e HMBC (Anexos xxx), as estruturas foram definitivamente elucidadas.

Dados de RMN do alcalóide senecionina [1]

Segundo dados de RMN ¹³C e DEPT 135 (Anexos Figuras 39 e 40), a estrutura do alcalóide isolado (Composto [1]) apresenta 18 átomos de carbono, sendo

três metilas (C19, C21 e C18) com deslocamentos em δ_C 11,77; 14,2 e 15,15, respectivamente; metilenos (CH₂) dois quais dois estão ligados a um átomo de N3 com deslocamento em δ_C 53,1(C5) e 62,43 (C3); mais três metilenos em δ_C 29,55(14); 33,77(C6); 60,75(9) ; cinco átomos de carbono metínicos (CH) sendo dois ligados ao carbono sp² com deslocamentos em δ_C 135,5(C20) e 136,44(C2) e mais três átomos de carbono na região de campo alto em δ_C 39,48(13); 75,29(C7); 77,22(C8); dois átomos de carbono sp² (C=C) com deslocamento em δ_C 131,56 e 133,81 atribuídos aos átomos C1 e C15, dois sp² bem mais desblindados, característicos de grupos C=O, com deslocamentos em 169,01 (C16) e 178,2 (C11), além de um carbono quartenário com deslocamento em δ_C 76,56, atribuído ao átomo de carbono C12. Estas atribuições foram comparadas e se mostraram coerentes com os dados encontrados na literatura (Tabela 3) confirmando assim a estrutura do alcalóide senecionina.

Através da análise de RMN ¹H e com o auxilio da técnica de HMQC (anexos 38 e 41), foi possível identificar a presença de dois dupletos correspondentes às metilas C21 (δ_C 14,2) e C19 (δ_C 11,77) com deslocamentos químicos δ_H 1,75 e 0,91, respectivamente. Ambos com integral para 3 átomos de hidrogênio e com constante de acoplamento $J = 7,03$ Hz para H21 e $J = 6,64$ Hz para

H19. Pôde-se também observar um sinal em δ_H 1,32 na forma de simpleto, com integração para 3 átomos de hidrogênio, correspondente a outra metila C18 (δ_C 25,15). A presença de um duplete quase imperceptível na região de δ_H 1,77 é atribuída ao carbono C13.

Os átomos de hidrogênio em δ_H 1,97 e 2,19 são atribuídos ao grupo metileno C14 (δ_C 29,55), e apresentam-se como dupletos com constante de acoplamento $J = 13,19$ e $3,52$ Hz. Ainda na região que compreende em 2,18 ($J = 13,68$ Hz, d) podemos observar um duplete pouco definido, este atribuído ao carbono C6 (δ_C 33,77). Ligado também ao carbono C6 carbono, podemos observar um hidrogênio com deslocamento em δ_H 2,42, este apresentando multiplicidade de duploduplete e constante de acoplamento J menor que 2, Hz, indicando que o hidrogênio H6b acopla com dois átomos de hidrogênio do grupo metileno C5 (δ_{H5a} 2,46 e δ_{H5b} 3,27). Os átomos de hidrogênio ligados ao C5 com deslocamento químico em δ_C 53,1, apresentam-se como multipletos com integral para um hidrogênio cada.

Na região de campo alto, porém um pouco mais desblindados, podemos observar a presença de duploduplete em δ_H 3,4 com J menor que 2 e um duplete em δ_H 3,96 com $J = 16$ Hz, estes átomos de hidrogênio, foram atribuídos ao C3 com deslocamento químico em δ_C

62,43, com auxílio da técnica de HMQC. Nesta mesma região ainda podemos observar a presença de dois sinais bem distintos, um duplete com deslocamento químico em δ_{Ha} 4,1 e constante de acoplamento de $J = 11,7$ Hz atribuído ao C9 (δ_{C} 60,75) e um simpleto pouco definido com deslocamento químico em δ_{H} 4,3 atribuído ao C8 (δ_{C} 77,22).

Na região de campo baixo, podemos observar a presença de quatro sinais, sendo um simpleto em δ_{H} 5,01 referente ao C7 com deslocamento químico em δ_{C} 75,29 , um duplete em δ_{H} 5,4 e constante de acoplamento de $J = 12$ Hz, atribuído ao H9b, também há a presença de um simpleto bem desblindado com deslocamento químico em δ_{H} 6,2 , este atribuído ao C2 (δ_{C} 136) e por último um quarteto com integral para um hidrogênio com deslocamento químico em δ_{H} 6,5 e constante de acoplamento de $J = 7$ Hz.

Analisando o espectro de correlação heteronuclear a longa distância 3J (Anexo 41), foi possível definir o sistema -C5-N4-C3-C2-C1-C9-, onde os átomos e os átomos de hidrogênio H9a,b (δ_{H} 5,4-4,1) acoplam fracamente com os átomos de carbono C1 (δ_{C} 131,56), C2 (δ_{C} 136,44) e C11 (δ_{C} 178,2), e fortemente com o átomo de carbono C8 (δ_{C} 77,22). O hidrogênio H3 (δ_{H} 3,4) acopla fracamente com os átomos de carbono C1, C2 e C5 (δ_{C}

53,1). Os demais átomos de carbono envolvidos no sistema pirrol não demonstram acoplamento a longa distância com seus hidrogênio vizinhos.

Por outro lado, o fragmento éster (Figura 18) da estrutura apresenta acoplamento bastante forte. Podemos observar através do espectro que o átomo de carbono mais desblindado da estrutura, característico de C=O, atribuído ao C11 (δ_C 178,2) acopla fortemente com o átomo de hidrogênio H18 (δ_H 1,32), o átomo de carbono quaternário mais protegido magnéticamente, atribuído ao C12 (δ_C 76,56), demonstra acoplamento forte com o hidrogênio H19 (δ_H 0,9) e H18 (δ_H 1,32). Além deste, o átomo de carbono metínico C13 (δ_C 39,48) também acopla fortemente com os átomos de hidrogênio H19 e H18. O carbono metilênico C14 demonstra acoplamento forte com o átomo de hidrogênio H19, por outro lado apresenta um acoplamento de fraca intensidade com o átomo de hidrogênio H20 (δ_H 6,5). O carbono sp^2 denominado bastante desblindado (δ_C 133,81) apresenta acoplamento de forte intensidade com o átomo de hidrogênio H21 (δ_H 1,75) e de fraca intensidade com o átomo de hidrogênio H13 (δ_H 1,77). O segundo átomo de carbono mais desblindado atribuído à outra carbonila da estrutura, denominado C16 (δ_C 169) apresenta acoplamento de fraca intensidade com o átomo de hidrogênio H20 (δ_H 6,5) e por último o carbono

metínico C20 (δ_C 135,5) apresenta acoplamento de forte intensidade com o hidrogênio H21 (δ_H 1,75).

Figura 18: Correlação heteronuclear HMBC

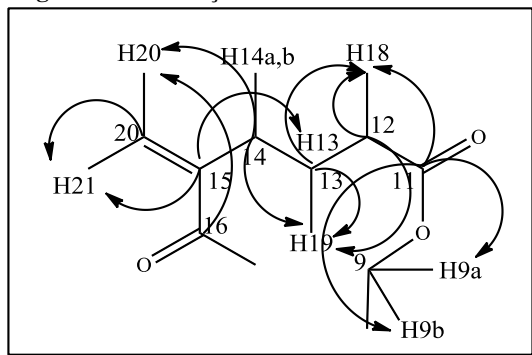
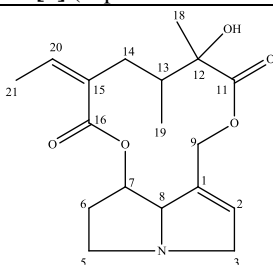


Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C do alcalóide Senecionina [1] (experimental e da literatura)



					literatura
Nº	DEPT	$\delta^{\circ}\text{C-C}$	$\delta^{\circ}\text{H-C}$	$\delta^{\circ}\text{C-C}^*$	$\delta^{\circ}\text{H-C}^{**}$
C1	C=C	131,56	-	131,5	-
C2	CH	136,44	6,21 (br,s, 1H)	136,6	6,18
C3	CH2	62,43	3,4(dd, $J=1,00$ Hz, 1H) 3,96(d, $J=16,02$, Hz, 1H)	62,9	3,38Ha; 3,93Hb
C5	CH2	53,1	2,46-2,56 (m, 2H) 3,27 (br, s., 1H)	53,10	2,53Ha, 325Hb
C6	CH2	33,77	2,10 (d, $J=13,68$ Hz, 1H) 2,42 (dd, $J=1,00$ Hz, 1H)	34,8	2,13 Ha, 2,37Hb

tabela 3 continuação					
C7	CH	75,29	5,01 (m, 1H)	75	5
C8	CH	77,22	4,33 (br. s, 1H)	77,66	4,27
C9	CH ₂	60,75	4,10 (d, <i>J</i> =11,72 Hz, 1H) 5,41 (d, <i>J</i> = 13,68 Hz, 1H)	60,6	4,03 Ha, 5,48 Hb
C11	C=O	178,2	-	178,1	-
C12	C	76,56	-	76,7	-
C13	CH	39,48	1,77 (m, 1H)	38,4	1,65
C14	CH ₂	29,55	1,97 (d, <i>J</i> = 13,29 HZ, 1H) 2,19(d, <i>J</i> = 3,52 HZ, 1H)	38,3	1,75 Ha, 2,16Hb
C15	C=C	133,81	-	133,1	-
C16	C=O	169,01	-	167,5	-
C18	CH ₃	25,15	1,32 (s, 3H)	25	1,31
C19	CH ₃	11,77	0,91 (d, <i>J</i> =6,64 Hz, 3H)	11,1	0,9
C20	CH	135,5	6,51 (q, <i>J</i> =7,03 Hz, 1H)	134	5,71
C21	CH ₃	14,2	1,75 (d, <i>J</i> =7,03Hz, 3H)	15	1,82

*(Molyneux *et al.*, 1982)

** (Xie, Li e Row, 2010)

Dados de RMN do alcalóide N-óxido senecionina [2]

Os dados obtidos com auxílio de espectrometria de ressonância magnética RMN ¹H, ¹³C e ATP para o alcalóide N-óxido senecionina [2] são bastante semelhantes ao alcalóide senecionina, havendo pequenos diferenças de deslocamento químicos em função do grupo N-óxido.

Semelhantemente ao alcalóide senecionina, os dados de RMN ¹³C e ATP (Tabela 4, Anexos 43 e 44), a estrutura do alcalóide isolado (Composto [2]) apresenta 18 átomos de carbono, sendo duas metilas C19 e C21 com deslocamentos em δ_C 11,8; 14,44 e outra metila C18 um

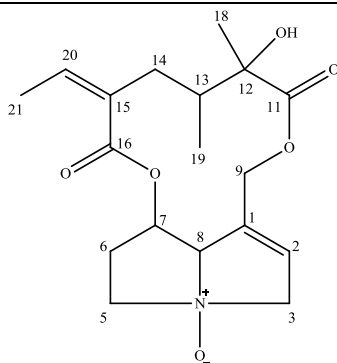
pouco mais desblindada com deslocamento químico em δ_C 25,16; da mesma forma que o alcalóide senecionina. Este alcalóide também apresenta cinco átomos de carbono metilênicos (CH_2) dois quais dois estão ligados a um átomo de N3, diferentemente do composto senecionina estes átomos se apresentam bem mais desblindados, com deslocamento em δ_C 60,75 (C5) e 78,33 (C3), indicando assim a presença de um átomo bastante eletronegativo ligado ao N3. Os dados de carbono ^{13}C demonstram a presença de mais três átomos de carbono metilênicos em δ_C 29,38(14); 32,45(C6); 69,02(9); cinco átomos de carbono metínicos (CH) sendo dois ligados ao carbono sp^2 com deslocamentos em δ_C 131,32 (C20), menos desblindado que o do composto anterior, e 138,1(C2), mais desblindado que o composto anterior. Apresentam também três átomos de carbono na região de campo alto em δ_C 39,5(13); 73,65(C7); e C8 em δ_C 95,78 do composto anterior, visto que este se encontra a duas ligações do átomo de oxigênio eletronegativo; também pode-se observar dois carbono sp^2 ($C=C$) com deslocamento em δ_C 129,72 e 132,43 atribuídos aos átomos de carbono C1 e C15, dois sp^2 bem mais desblindados, característicos de grupos $C=O$, com deslocamentos em 168,08 (C16) e 178,06(C11) , além de um carbono quartenário com deslocamento em δ_C 77,48 , atribuído ao átomo de carbono

C12. Estes dados corroboram com os dados obtidos por espectrometria de massa (LC/MS/MS) onde se pode observar que os alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] apresentam apenas uma diferença estrutural, sendo um átomo de oxigênio ligado ao átomo de nitrogênio presente na molécula.

Analisando o espectro de RMN ^1H (Anexo 42) não se observa muitas diferenças, sendo apenas nos átomos de hidrogênio ligados ao carbono próximo ao grupo N3-O, sendo os átomos de hidrogênio atribuídos ao carbono C3 (δ_{C} 78,33) H3a em δ_{H} 3,67 com multiplicidade de tiploduplete, integração para um hidrogênio e constantes de acoplamento de $J = 10,75$ e $6,64$ Hz, e outro hidrogênio H3b em δ_{H} 3,86 com multiplicidade de duploduploduplete e constantes de acoplamento de $J = 11,43$; $7,33$ e $4,30$ HZ. Os átomos de hidrogênio atribuídos ao carbono C5 (δ_{C} 60,75) apresentam deslocamento químico na faixa de δ_{H} 2,89 – 3,03 com multiplicidade de multiplete e outro hidrogênio com deslocamento em δ_{H} 3,26. E por último, o carbono que apresenta deslocamento químico bastante diferente do composto anterior é o carbono C8 (δ_{C} 95,78), cujo hidrogênio se apresenta como duploduplete, com deslocamento químico maior que do composto anterior, δ_{H} 4,83. Os demais sinais no espectro de RMN ^1H , são bastante semelhante ao composto senecionina [1]

evidenciando a semelhança estrutural de ambos os alcalóides. Todos os dados estão na tabela abaixo.

Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C : experimentos e da literatura do alcalóide N-óxido Senecionina [2]



Nº	DEPT	$\delta\text{C-C}$	$\delta\text{H-C}$
C1	C=C	129,72	-
C2	CH	138,1	6,27 (m, 1H)
C3	CH2	78,33	3,86(ddd, $J= 11,43, 7,33, 4,3$, Hz, 1H) 3,67 (td, $J= 10,75, 6,64$ Hz, 1H)
C5	CH2	60,75	2,89-3,03 (m, 2H) 3,26 (br, s., 1H)
C6	CH2	32,45	2,23 (m, H) 2,43 (dd, 1H)
C7	CH	73,65	4,80 (d, $J=5,47$ Hz, 1H)
C8	CH	95,78	4,83 (dd, 1H)
C9	CH2	69,02	4,22 (d, $J=12,11$ Hz, 1H) 5,46 (m, 2H)
C11	C=O	178,06	-
C12	C	77,48	-
C13	CH	39,5	1,86 (m, 1H)
C14	CH2	29,38	1,7 (d, $J= 13,29$ HZ, 1H) 2,16 - 2,27(m, 2H)
C15	C=C	132,43	-
C16	C=O	168,08	-

tabela 4 continuação			
C18	CH3	25,1	1,34 (s, 3H)
C19	CH3	11,8	0,92 (d, $J=7,03$ Hz, 3H)
C20	CH	131,32	6,65 (q, $J=6,80$, 1H)
C21	CH3	14,44	1,79 (s, 3H)

DETERMINAÇÃO DE pK_a E MOBILIDADE IÔNICA DOS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS. QUANTIFICAÇÃO DA SENECONINA [1] E N-OXIDO SENECONA [2] NOS EXTRATOS DA FLOR E FOLHA DA ESPÉCIE *Senecio brasiliensis*.

Os alcalóides são considerados uns dos principais constituintes tóxicos nas plantas. O gênero *Senecio* possui em sua constituição química uma quantidade bem variada de alcalóides do tipo pirrolizidínicos, sendo a senecionina é o principal alcalóide presente na planta. No entanto, a planta sintetiza e acumula este alcalóide na forma de N-oxido (Hartmann e Toppel, 1987)

Vários métodos para a determinação de alcalóides pirrolizidínicos (AP) nas plantas tem sido reportado. Uma das técnicas mais comuns devido à estrutura dos alcalóides é com o emprego de CG-MS e LC-MS (Brauchli, 1982; Lin, 1998; Gray, 2004; Wuilloud, 2004; Colegate, 2005; Mroczek, 2006). No entanto, GC-MS não é uma técnica muito adequada para detectar os alcalóides pirrolizidínicos

em sua forma N-óxido, visto que estes compostos são termicamente instáveis, uma vez que estas estruturas sofrem decomposição térmica originando o alcalóide correspondente. A pre-redução do N-óxidos seguido pela derivatização é necessária para que se efetue a análise em CG-MS (Liu, 2009). Outra técnica de separação para analisar estes alcalóides é a eletroforese capilar (CE) (Costa, 2007). Esta técnica oferece vantagens atrativas, incluindo baixo consumo de reagentes e amostras, boa resolução, menor geração de resíduo, além de sua capacidade de análise de compostos termicamente instáveis.

A fim de determinarmos a concentração dos compostos senecionina e seu correspondente N-óxido nas flores da espécie *Senecio brasiliensis*, foi desenvolvido e validado um método usando eletroforese capilar.

O desempenho vantajoso deste método foram os resultados de um procedimento de otimização sistemática (Costa, 2007; Gonçalves Filho e Micke, 2007) com base na determinação da mobilidade efetiva *versus* pH, e a avaliação dos parâmetros de eletrólito obtidos a partir do software Peakmaster (Gaš, 2001; Štědrý, 2002; 2003).

Uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de métodos para CZE (capillary zone electrophoresis) é o uso

da curva da mobilidade efetiva versus pH. A inspeção da curva da mobilidade efetiva permitiu a determinação do pH, e a escolha do padrão interno, além de ajudar a determinar o modo de operação (co ou contra fluxo eletroosmotico)

A melhor escolha dos componentes de BGE, suas concentrações e as condições operacionais (voltagem, tamanho do capilar, comprimento de onda, temperatura do cartucho) podem ser otimizadas usando o software Peakmaster, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Gaš (Gaš, 2001; Štědrý, 2003). Este software é uma ferramenta útil para pré-determinar alguns parâmetros do tipo fenômeno de dispersão por eletromigração (EMD), a capacidade tamponante, e a condutividade do BGE na ordem de reduzir o efeito Joule (Costa, 2007; Gonçalves Filho e Micke, 2007).

Para o uso do Peakmaster e para construir a curva da mobilidade efetiva é necessário que se saiba o pKa bem como a mobilidade iônica do analito.

Desta forma, o presente estudo vem através de um procedimento sistemático determinar os valores de pKa e mobilidade iônica dos alcaloides senecionina e N-óxido senecionina. Um ponto comum na determinação destas constantes é a necessidade do conhecimento da actual

mobilidade (μ_{act, BH^+}), onde a espécie esteja totalmente ionizada numa dada condição de força iônica.

a) Determinação do pKa

Primeiramente, foi determinado o pKa dos analitos. Este procedimento foi realizado por eletroforese capilar usando método desenvolvido por Fuguet *colaboradores* (Fuguet *et al.*, 2009), onde o autor mostrou que o valor de pKa pode ser calculado usando a seguinte equação2:

Equação 2 Calculo para a determinação do pKa

$$pKa_{analyte} = pka_{IS} - \log\left(\frac{\mu_{act, BH^+} - \mu_{eff}}{\mu_{eff}}\right) + \log\left(\frac{\mu_{IS, BH^+} - \mu_{eff}(IS)}{\mu_{eff}(IS)}\right)$$

Onde, μ_{eff} é a mobilidade do composto em um pH, quando não esta totalmente ionizado; μ_{act, BH^+} é a mobilidade do composto em um pH, quando está totalmente ionizado e IS é o padrão interno. A escolha adequada do padrão interno é muito importante, visto que o pKa do padrão interno deve ter um valor próximo ao do analito.

Com base na literatura (Chemicalize.Org; Hilal, 1994) os valores de pKa para senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] são aproximadamente 7,1 e 5,9.

Inicialmente foi realizada uma análise em pH 6, baseado no valor de pKa estimado para senecionina N-óxido[2]. O valor de mobilidade efetiva para a senecionina N-óxido[2] foi muito próximo de zero indicando assim, que o pKa desse analito é de fato menor que 5. Desta forma, foi realizada uma análise em pH 5 sendo possível determinar o valor de μ_{eff} . Para este procedimento foi selecionada como padrão interno a creatinina (pKa 4.8).

Para determinar o pKa da senecionina[1] foi realizada uma análise em pH 8 onde, foi possível obter o valor de μ_{eff} sem a necessidade de análises adicionais. Na determinação do pKa da senecionina[2] foi utilizado como padrão interno a lidocaina (pKa 7.8).

Definidos os valores de pH para obtenção de μ_{eff} para ambos analitos, foi determinado então os valores de μ_{act,BH^+} . Este procedimento foi realizado em pH 2 (FI 10 mmol L⁻¹), onde todos os compostos estão com mais de 99% de sua carga efetiva. Os valores de μ_{act,BH^+} foram obtidos através do procedimento Williams e Vigh's (Williams e Vigh, 1996), usando acetona como marcador neutro.

Usando a μ_{eff} e μ_{act,BH^+} foi possível calcular o pKa para a N-oxido senecionina e senecionina, onde os valores obtidos foram 3,92 para N-oxido senecionina e 8,3 para senecionina.

b) Determinação da mobilidade iônica

Para a determinação da mobilidade iônica foram utilizados os valores de μ_{act,BH^+} obtido anteriormente. Para a obtenção da mobilidade iônica (mobilidade da espécie em diluição infinita) podemos aplicar a equação de Onsanger, uma vez que a solução de eletrólitos univalente a 25°C é descrita pela equação 3(Boček, 1988).

Equação 3 Equação de ONSANGER

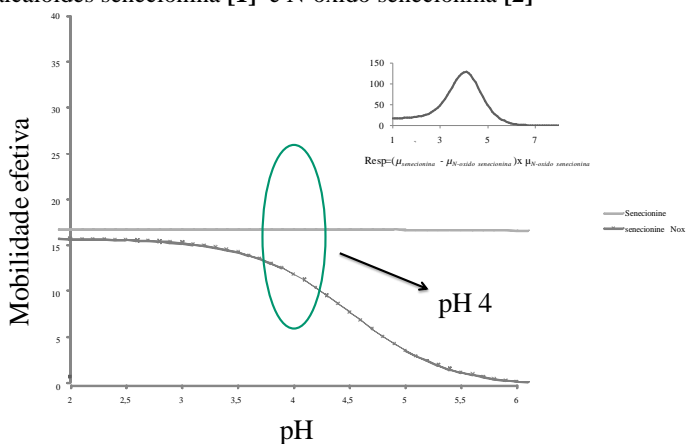
$$\mu_{act,BH^+} = \mu_{0,BH^+} - \left[0.23\mu_{0,BH^+} + 31.3 \times 10^{-5} \right] \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}$$

Determinados os valores de pKa e mobilidade iônica, foi possível construir a curva de mobilidade versus pH usando a equação 4.

Equação 4: Equação da curva da mobilidade iônica versus pH

$$\mu_{eff, BH^+} = \frac{\mu_{0, BH^+}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Figura 19: Gráfico da mobilidade efetiva versus pH para os alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2]



A partir da curva de mobilidade obtida, foi possível verificar que usando um pH em torno de 4 consegue-se uma boa separação entre os analitos. O uso da β-alanina como co-ion (componente do eletrólito na corrida (BGE) com mesma carga do analito) favorece a obtenção de picos simétricos pela redução do valor da dispersão pela eletromigração (EMD). O uso do contra-ion (componente do eletrólito de corrida com carga oposta ao

do analito) com um pKa em torno de 4 aumenta a capacidade tamponante do BGE. Sendo assim, o contra íon escolhido foi o ácido fórmico de pKa 3.75.

Com base na curva de mobilidade efetiva (Figura18), a escolha do método de pH foi dada pela equação 5.

Equação 5: Equação para obtenção de pH ótimo para a determinação da mobilidade iônica

$$Re\ sp = (\mu_{senecionine} - \mu_{senecionineN-oxide}) \times \mu_{senecionineN-oxide}$$

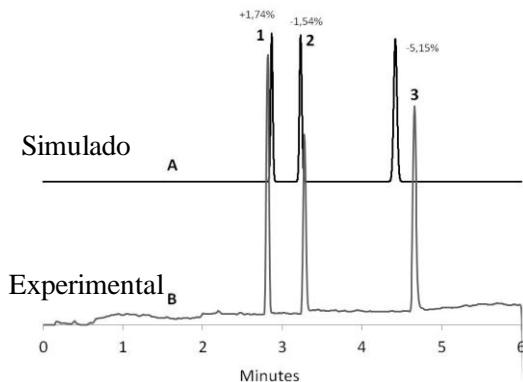
Onde, $\mu_{senecionina}$ é a mobilidade do analito senecionina e $\mu_{senecionina\ N-oxido}$ é a mobilidade do analito senecionina N-oxido.

A melhor resposta é conseguida quando observamos uma alta resolução e uma maior mobilidade da senecionina N-oxido. Para este experimento a resposta máxima foi obtida em pH 4. O co-ion e o contra-íon (β -alanina/ácido fórmico) foram escolhidos, bem como o pH de eletrólito de corrida. Para corroborar com esta resposta foi simulado os eletroferogramas com o auxílio do software Peakmaster.

Usando o BGE composto por 57 mmol.L⁻¹ de β-alanina e 20 mmol.L⁻¹ de ácido fórmico, os seguintes parâmetros foram obtidos para o BGE: pH = 4, força iônica 13.29, condutividade 0.115 e capacidade tamponante de 33.9. Os valores de mobilidade efetiva e EMD obtidos foram de: μ_{eff} 19.5 e EMD 1.9 para senecionina [1] e μ_{eff} 8.9 e EMD 0.6 para senecionina N-óxido [2]. Os valores de mobilidade efetiva indicam a alta resolução na separação e os valores de EMD indicam que os picos obtidos são simétricos. O valor de condutividade do BGE é baixo e sendo assim a corrente elétrica deverá ser baixa, minimizando o efeito Joule. E por fim a capacidade tamponante é alta.

Para aumentar a precisão e exatidão do método um padrão interno foi incluído. Neste caso, com base na mobilidade dos analitos em pH 4, a histidina foi escolhida como padrão interno. Preparando um eletrólito ótimo e realizando um “Trial run”, foi possível medir o valor da mobilidade do fluxo electroosmótico para realizar a simulação do eletroferograma. A Figura 19 apresenta os eletroferogramas: simulado 2A e o experimental 2B.

Figura 20: Sobreposição dos eletroferogramas: (A) experimental (Peakmaster electroferograma gerado) e (B) simulado.



O sistema de eletrólito é composto de 57 mmol L⁻¹ β-alanina e 20 mmol L⁻¹ de ácido fórmico (pH 4,0). Outras condições: capilares com 48,5 centímetros de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica (50 mbar, 6 s), 25 kV tensão aplicada; 25 °C e detecção direta em 218 nm. Legenda dos picos: 1, histidina (padrão interno), 2 - senecionina [1] e 3 - N-óxido senecionina [2].

Podemos observar que existe entre os eletroferogramas: simulado e experimental uma boa concordância. O desvio no tempo de migração foi de - 6,6% para senecionina N-óxido [2] e -1.2% para senecionina [1].

c) Validação de dados

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, a validação dos seguintes parâmetros foram avaliadas: linearidade, precisão, recuperação (como medida de precisão), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Os dados de desempenho analítico e algumas figuras de mérito do método proposto estão na Tabela 5. O valor RSD para a precisão instrumental, a repetibilidade (precisão intra-dia, $n=3$) e precisão intermediária (precisão inter-dia, $n=3$) tempo de migração e área dos picos foram melhor que 7,9% e 8,7%, respectivamente. As curvas analíticas compreende em concentrações de 50 a 125 mg L⁻¹ a partir das soluções padrões de 1000 mg L⁻¹, com triplicata de injeção para cada concentração. O coeficiente de correlação foi de $r>0.99$. A precisão do método foi estabelecida pelo teste de recuperação de três concentrações: 50, 75 e 100 mg L⁻¹. A recuperação foi obtida com uma variação de 95.4.0 – 107.7%. O LD (sinal/ruído = 3) e LQ (sinal/ruído = 10) determinado pelos eletroferogramas dos padrões foram de 0.97 e 3.2 mg L⁻¹, respectivamente. O número de pratos teóricos para senecionina[1] e N-oxido senecionina [2] foi de 67000 e 60000, respectivamente.

Tabela 5: Parâmetros para determinar senecionina [1] e N-óxido senecionina[2] no extrato.

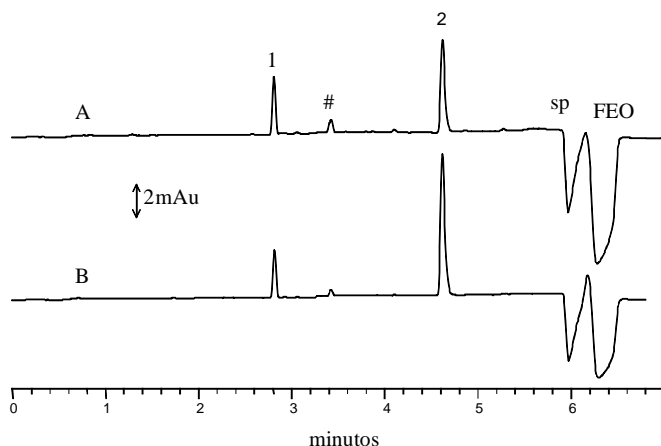
Parâmetros	n	Senec	N-OX
Numero de pratos (N/metro)		67000	60000
Precisão intra-dia (RSD %); tempo migração	3	3.1	3.6
Precisão intra-dia (RSD %); área pico	3	4.9	5.3
Precisão inter-dia (RSD %); tempo migração	3	6.7	7.8
Precisão Inter-day (RSD %) área pico	3	7.9	8.7
Linearidade – slope		0.0225	0.0299
Desvio padrão slope		0.0006	0.0006
Linearidade – intercept		0.212	0.242
Desvio padrão intercept		0.098	0.093
Continuação tabela 6			
Linearidade – coeficiente de correlação		0.998	0.998
F		1521	2418
Precisão (% recuperação) add 50 mg/L		96.7	95.4
Precisão (% recuperação) add 75 mg/L		105.7	97.4
Precisão (% recuperação) add 100 mg/L		107.7	106.5
LOQ (mg.L ⁻¹)*		2.6	3.2
LOD (mg.L ⁻¹)*		0.8	0.97

*sinal/ruído

d) Análises das amostras

A Figura 21 mostra o eletroferograma dos extratos das flores (B) e folhas (A). Conforme podemos observar o resultado quantitativo da N-oxido senecionina [2] para as folhas foi de $0.89(\pm 0.04)$ - $3.49(\pm 0.05)$ mg/g, com média de 2.00 ± 0.95 n=5; já para as flores foi de $1.32(\pm 0.05)$ - $5.95(\pm 0.12)$ mg/g, com média de 3.19 ± 1.72 n=5. Os valores das medias entre as flores e folhas são diferentes, no entanto, os valores obtidos para as concentrações são estatisticamente iguais. A quantidade de senecionina [1] encontrada tanto nas folhas quanto nas flores foi menor que o limite de quantificação (LOQ), não sendo possível estimar a concentração do composto [1] na planta. Este dado vem de acordo com um trabalho realizado por Hartmann (Hartmann, 1989) onde o autor relata que o N-oxido é o produto da biossíntese primeiramente sintetizado e translocado através das folhas e flores na espécie *Senecio vulgaris* L.

Figura 21: Eletroferogramas dos extratos das folhas (A) e flores (B).



O sistema de eletrólito é composto de 57 mmol.L⁻¹ β-alanina e 20 mmol L-1 de ácido fórmico (pH 4,0). Outras condições: capilares com 48,5 centímetros de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica (50 mbar, 6 s), 25 kV tensão aplicada; 25 °C e detecção direta em 218 nm. Legenda dos picos: 1, histidina (padrão interno), 2 - senecionina[1] e 3 - N-óxido senecionina [2].

USO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO FERRAMENTA ANÁLITICA NA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE ADMET

Para o entendimento e desenvolvimento de um fármaco, conhecer suas propriedades físico-químicas são um dos primeiros passos para o processo de ADMET.

Dentre estas propriedades, a lipofilicidade e a permeabilidade são um dos principais parâmetros envolvidos no processo farmacocinético, tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Uma baixa ou alta solubilidade e permeabilidade são determinantes no processo de desenvolvimento de uma droga, sendo assim o coeficiente de partição, $\log P$ e o modelo de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) são ferramentas indispensáveis na previsão do transporte e distribuição de uma determinada molécula. (Dreassi *et al.*, 2009)

Determinação do coeficiente de partição e $\log P$ utilizando eletroforese capilar.

O coeficiente de partição ($\log P$) é utilizado para determinar a lipofilicidade e pode ser obtido por medição direta através de processo experimental shake flask, por outro lado pode ser obtido de forma indireta através de métodos teóricos, ou ainda através de métodos experimentais cromatográficos.

Para a determinação de $\log P$ dos alcalóides pirrolizidínicos estudados neste trabalho foi utilizada técnica de eletroforese capilar utilizando um mecanismo de separação em MEKC (cromatografia micelar capilar). Este

mecanismo está baseado no particionamento de solutos entre a fase aquosa e a fase micelar (fase pseudo-estacionária), sendo assim é possível relacionar este particionamento com a hidrofobicidade dos analitos. O tempo de migração de um soluto é diretamente proporcional a sua hidrofobicidade. Em MEKC assim como em cromatografia é possível calcular o fator de retenção (K) usando a equação 6

Equação 6: Calculo do fator de retenção K

$$k = \frac{t_m - t_{eof}}{t_{eof} \left(1 - \frac{t_m}{t_{mc}}\right)}$$

Onde t_m é o tempo de migração do soluto, t_{eof} é o tempo de migração do fluxo eletroosmótico e t_{mc} é o tempo de migração da micela.

O tempo de migração do fluxo eletroosmótico é marcado pelo tempo de migração de um solvente que não interaja com a micela. Para este trabalho foi utilizado acetona como marcador. O tempo de migração da micela é marcado pelo tempo de migração de um composto que interaja mais com a membrana. Para este fim foi utilizado o pireno como marcador t_{mc} .

Calculando-se os valores de k para solutos com log P conhecidos é possível construir um modelo de calibração do tipo: $\log P = A \times \log k + B$ e desta forma usá-lo para determinar o valor de log P para solutos de interesse.

O eletrólito de corrida utilizado foi baseado no método descrito por Adlard *e colaboradores* (Adlard *et al.*, 1995). Na Tabela 6 são apresentados alguns dados referentes aos padrões utilizados para a obtenção dos valores de log P dos analitos.

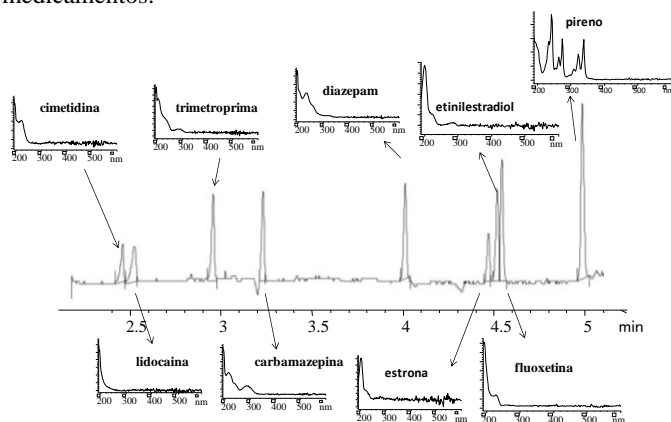
Tabela 6: Série de compostos utilizados na determinação de log P

Medicamento	logP	Permeab.	pKa
Cimetidina	0.40	-5.89	6.8
Lidocaina	2.44	-4.21	8.01
Trimetroprima	0.91	-	7.12
Carbomazepina	2.45	-	-
Diazepam	2.82	-4.32	3.4
Estrona	3.13	-	-
Etinilestradiol	3.67	-	-
Fluoxitina	4.05	-	-
Pireno			

É possível observar que todos os analitos estão neutro no pH 9, e que a faixa de valores de log P é bastante

ampla (0,4 – 4,0). Os valores obtidos de log P e pKa para os compostos modelos são experimentais. Na Figura 22 é apresentado o eletroferograma dos padrões.

Figura 22: Eletroferograma de experimento log P para os medicamentos.

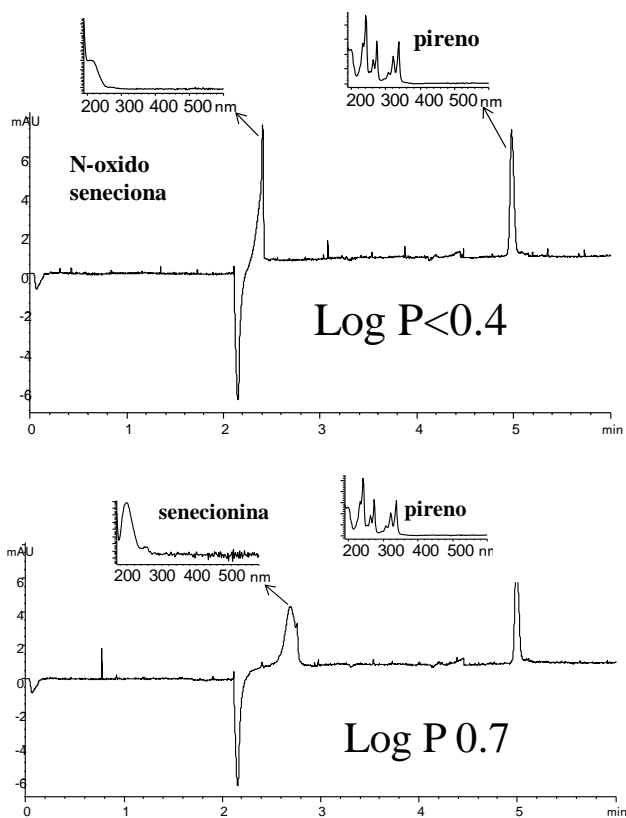


Condições: Micela deoxicolato de sódio 40 mmol L⁻¹, tampão tetraborato de sódio 12.5 mmol L⁻¹; capilar, 50 mm i.d. 48.5cm (40 cm do detector); + 25 kV; 214 nm; 25 °C. Amostras dissolvidas em BGE (10⁻³-10⁻⁵ mol L⁻¹), injeção sob pressão de 50 mBar/ 3s.

A partir do eletroferograma apresentado foram tomados os tempos de migração de cada analito, o fluxo eletroosmótico (tempo de migração da acetona) e o pireno (tempo de migração da micela) e através da equação 6 foram calculados os valores de fator de retenção (k) para cada analito.

Na Figura 23 são apresentados os eletroferogramas para a N-oxido senecionina [2] (A) e senecionina[1] (B) usando as mesmas condições.

Figura 23: Eletroferogramas do experimento para a determinação de log P para senecionina[1] e N-oxido senecionina[2]



O modelo obtido para os padrões foi $\log P = x \log k - y$ ($n=6$, $R^2 = 0.91$) com $\log P$ variando de 0,4 – 4,08. O valor de k para a N-oxido senecionina [2] ficou abaixo do menor ponto de calibração do modelo, assim o valor de $\log P$ para este composto foi determinado como $< 0,4$, para a senecionina [1] o valor de k ficou de 0,5 e o valor de $\log P$ ficou de 0,7. Concluindo assim que o coeficiente de partição do N-oxido [2] é menor do que o da senecionina [1], logo este composto não será carregado e por fim transportado pelo sistema, no entanto a senecionina [1] possui um valor de coeficiente de partição passível de ser transportado pelo meio micelar e chegará até a membrana biológica. O que nos leva a crer que se ingerido o N-oxido senecionina [2] deverá passar por redução enzimática, gerando o composto senecionina [1] e portanto atravessará a membrana biológica, caso o contrário ele tenderá a ser excretado, e levando em conta a toxidez destes compostos, este dado seria desejável..

Determinação da interação dos alcalóides pirrolizidínicos senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] com albumina humana utilizando eletroforese capilar no modo PF-ACE patial fillin- affinity capillary electrophoresis.

A atividade farmacológica de um fármaco é relacionada com a sua concentração na forma de fármaco livre, o que determina a dose terapêutica considerada ótima para um fármaco. A concentração de fármaco livre depende do grau de ligação com a proteína carreadora. Esta interação proteína-fármaco que pode ser determinada por diversas técnicas, tais como diálise de equilíbrio (ED) (Lipinski *et al.*, 1997; Lipinski, 2000), de ultrafiltração (UF)(Navia e Chaturvedi, 1996), ressonância de plasma de superfície (SPR)(Palm *et al.*, 1997), LC (Clark, 1999), e ultracentrifugação (UC)(Veber *et al.*, 2002) e CE (Zhang *et al.*, 2011).

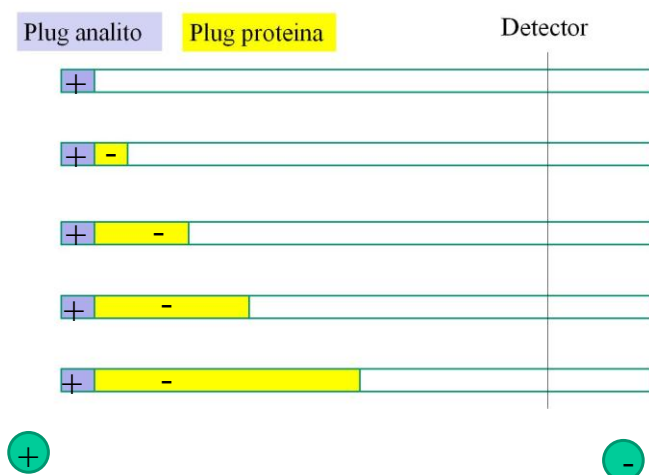
Existe atualmente um grande interesse no estudo de proteínas de ligação e novas metodologias tem sido desenvolvidas visando sua otimização tais como: menor tempo de análise, materiais de menor dimensão, baixo consumo de amostra, solvente e alta eficiência.

A Eletroforese Capilar, em especial a eletroforese capilar por afinidade (ECA) é uma das poucas técnicas que podem ser usadas para determinar proteína de ligação em seu estado nativo. A ACE é uma variante da EKC (eletrocromatografia capilar) onde a separação se dá essencialmente em solução livre na ausência de pseudo fase (micelas, lipossomas, proteínas, agentes complexantes e etc). A presença de pseudo fase altera a mobilidade eletroforética do analito. Esta variação de mobilidade é utilizada para determinação de constante de interação entre o analito e constituinte da pseudo-fase. (Zhang *et al.*, 2011)

Outro método para a determinação de interação droga-proteína é o método PF-ACE (partial filling). Este método envolve o preenchimento parcial do capilar com a solução da proteína e pode variar tanto na concentração da proteína, quanto no tamanho do plugue (Figura 24). Em PF-ACE a interação ocorre quando a tensão é aplicada. Durante a eletroforese, o substrato migra através do plugue da proteína e ambos ficam disponíveis um ao outro. Neste caso é necessária uma maior concentração da proteína se comparado com o método clássico por ACE (affinity capillary electrophoresis), pois o tamanho do plugue é geralmente muito menor quando comparado com o tamanho total do capilar (Nilsson *et al.*, 2004). Em PF-

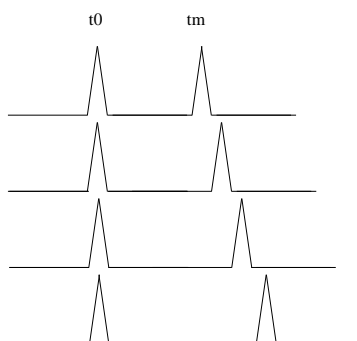
ACE, o tempo de migração do substrato é monitorado e os dados são tratados de maneira análoga à ACE, utilizando valores de mobilidade como sistema de resposta para associações 1:1.

Figura 24: Método modelo para a determinação de interação proteína-droga por Partial Filling



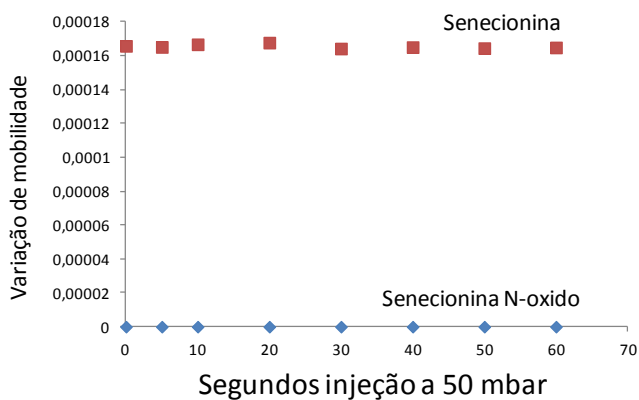
O tipo de resposta esperada no caso de interação com a proteína está ilustrado na Figura 25. Onde a medida que a medida que o analito interage com a proteína humana, o tempo de migração irá modificando.

Figura 25: Dados simulados esperados para o Modelo Partial Filling



A partir das mudanças de mobilidade efetiva é possível obter a constante de associação analito-proteína pois a variação de mobilidade efetiva fica dependente do número de mols de proteína que o analito interage até atingir o detector (Figura 25).

Figura 26: Gráfico do experimento interação de proteína com senecionina [1] e N-óxido senecionina[2]



Na Figura 26 é apresentado um gráfico da variação da mobilidade efetiva variando-se o tamanho do plug de proteína injetado em um eletrólito composto por fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹ pH 7,4. Foi utilizada uma concentração de proteína de 50 µM preparada no mesmo eletrólito de corrida. A proteína foi injetada em um plug variável, e em seguida foi injetado o analito. Todas as injeções foram efetuadas sob pressão. Após preencher o capilar com proteína e analito, foi aplicada voltagem de 25 Kv. Neste experimento esperava-se que caso houvesse interação analito-proteína, o analito deveria mudar sua mobilidade. No entanto, não houve variação de mobilidade, podemos concluir que os compostos senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] não interagem com a proteína albumina humana. Estes resultados podem ser observados através do gráfico da Figura 26. Onde não há nenhuma alteração na mobilidade dos compostos após atravessar o plug da proteína. Estes dados, vem de encontro com os dados obtidos para determinação do coeficiente de partição, visto que tendo os compostos um coeficiente de partição muito pequeno certamente eles não interagiriam com a proteína carreadora, e desta forma não atravessariam a membrana biológica.

Eletroforese capilar como ferramenta analítica na determinação da permeabilidade artificial em membrana paralela (PAMPA)

De acordo com Hartmann (Hartmann e Toppel, 1987; Hartmann *et al.*, 1989) o N-óxido é o produto primário na biossíntese dos alcalóides pirrolizidínicos. Na espécie *Senecio vulgaris* L. foram encontrados alta concentração de alcalóides nas flores, mais que nas folhas. No entanto, esta distribuição pode variar de espécie para espécie.

Segundo dados encontrados na literatura a senecionina base livre é formada a partir da redução da N-óxido senecionina provocada por constituintes comumente encontrados tal como a cisteína. (Hartmann e Toppel, 1987) Os alcalóides pirrolizidínicos encontrados no Gênero *Senecio* tais como senecionina e N-óxido senecionina são hepatotóxicos, e geralmente são ingeridos por animais durante épocas de estiagem e seca, e esta alimentação do gado o leva à morte. Em humanos não há aplicações da espécie *Senecio brasiliensis* como fitoterápico, sendo então estes alcalóides ingeridos em produtos gerados a partir de material vegetal que contém estes alcalóides tal como o mel (Reinhard, Janke, Ohe, *et al.*, 2009; Kempf *et al.*, 2010; Dübecke, Beckh e Lüllmann, 2011).

Para estudos farmacológicos destes alcalóides administrados por via oral, é interessante o conhecimento da permeabilidade dos mesmos no intestino. Para tanto, neste trabalho foi utilizado o ensaio de permeabilidade denominado modelo de Membrana Artificial Paralela (“Parallel Artificial Membrane Assay” – PAMPA), proposto por Wohnsland e Faller (Wohnsland e Faller, 2001) com algumas modificações na determinação da permeabilidade dos alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2].

Resultados obtidos para a determinação de permeabilidade em membrana

a) Otimização do BGE e estratégia de múltipla injeção.

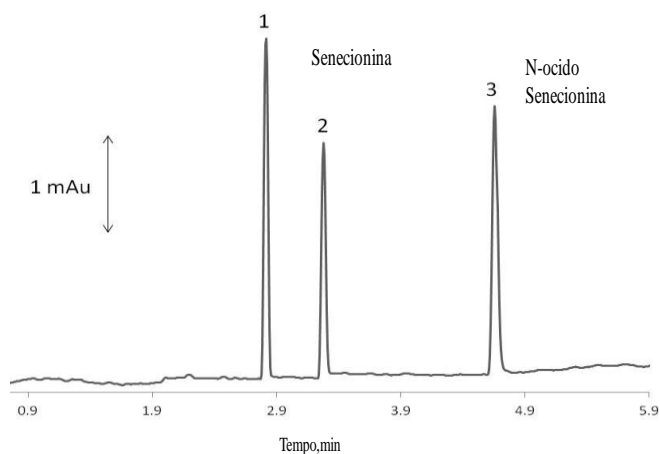
A estratégia de injeção múltipla foi utilizada para desenvolver um método simultâneo de determinação da senecionina[1] e N-óxido senecionina [2] em uma única corrida, fazendo do método bem mais eficiente e atrativo. Usando a equação 7, como proposta por Amini e colaboradores (Amini *et al.*, 2008), na qual é possível estimar um número máximo de injeções (n_s) para uma corrida, sem sobreposição de picos ou perda da eficiência.

Equação 7: Estimativa de numero de injeções para corrida em eletroforese capilar

$$n_s = \frac{\Delta t_{mig}}{12\sigma}$$

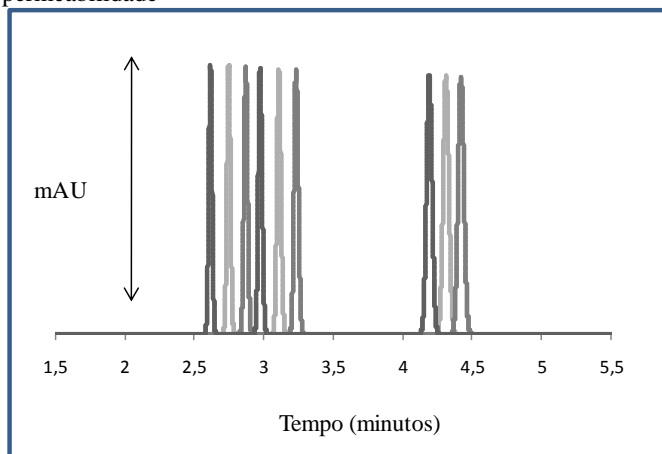
Onde Δt_{mig} é a variação, isto é, a diferença entre os tempos de migração dos analitos adjacentes no plug; σ é a média das larguras de picos adjacentes calculados a meia altura do pico dividida por 2.35; e 12 é o fator de multiplicação utilizado para garantir que no caso de picos assimétricos não haja sobreposição dos picos dos analitos.

Figura 27: Eletroferograma experimental



Com base nos dados obtidos a partir da corrida com uma única injeção (Figura 27), foi possível calcular o número máximo de injeções que poderia ser efetuadas no método. Usando a equação 7 foi possível determinar o número de plugs em uma única corrida, usando $\Delta t = 0,46$ e $\sigma = 0,3$ demonstramos que poderia ser introduzida três plugs neste sistema. Estes números de injeções foram suficientes para o método proposto, uma vez que determina simultaneamente as soluções doadora, aceptora e equilíbrio. Na Figura 28 é apresentado um eletroferograma simulado utilizando injeções múltiplas de uma mistura de padrões de senecionina [1] e N-óxido de senecionina [2].

Figura 28: Eletroferograma simulado para a determinação da permeabilidade



É possível observar que o limite de 3 injeções é realmente atingido. A utilização de software de simulação permite a otimização dos espaçadores entre os plugs de modo a reduzir o número de experimentos práticos. Para realização da simulação apresentada na Figura 28 é alterado o valor da distância do ponto de injeção até a detecção. Os valores utilizados foram respectivamente 40, 37 e 34 cm em seguida à simulação os dados foram exportados e plotados com ajuda do Microsoft Excel, seguindo a equação 8.

Equação 8: Determinação de limite de injeções

$$L_{inj} = \frac{\Delta P t_{inj} r^2}{8 L_{tot} \eta}$$

Onde ΔP é a pressão aplicada no capilar, r é o raio interno do capilar, t_{inj} é o tempo de injeção da amostra, η é a viscosidade da amostra e L é o comprimento total do capilar.

b) Figuras de mérito

Com o propósito avaliar as figuras de mérito do método proposto os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: linearidade, precisão intra-ensaio, limite de detecção e limite de quantificação. A linearidade foi

avaliada construindo-se uma curva de calibração para cada composto utilizando-se a razão entre a área do analito e a área do padrão interno como sinal analítico em 5 níveis de concentração (50-250 mg.L⁻¹). Os níveis foram preparados em duplicata e injetados em triplicata. As médias foram utilizadas para construção do modelo linear apresentando coeficiente de determinação maior que 0,999 para ambas as curvas. A Tabela 7 sumariza os resultados obtidos bem como os valores de desvio padrão.

Tabela 7: Tabela de parâmetros de figuras de mérito

Parâmetros		Senecionina	SNO
		Valor	Valor
Precisão intra-day (RSD%); tempo de migração	n = 3	1,8	2,2
Precisão intra-day (RSD %); área do pico	n = 3	1,1	1,7
Linearidade – slope		0,0104	0,0180
Desvio padrão - Slope		0,0001	0,0003
Linearidade – intercept		-0,0706	-0,1822
Desvio padrão Intercepty		0,0227	0,0427
Linearidade – coeficiente de correlação		0,9995	0,9994
F		5722	4864
LQ (mg L ⁻¹)*		21,9	23,8
LD (mg L ⁻¹)*		6,6	7,1

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada por replicas autênticas do nível intermediário da

curva cabendo ressaltar que padrões e amostras estão presentes em matrizes idênticas.

A determinação do limite de detecção foi feita utilizando-se parâmetros de curva analítica de acordo com a Equação 9.

Equação 9: Determinação de limite de detecção

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva de calibração.

Softwares de tratamento de dados, como o Microsoft Excel, auxiliam na construção da curva de calibração e obtenção dos parâmetros da curva analítica. O limite de quantificação do método simboliza a mínima concentração para a determinação da concentração do analito na amostra em análise. Este limite deve considerar concentrações analíticas com bons valores de precisão e exatidão para o sistema analítico, evitando comprometer a quantificação do analito na amostra.

O limite de quantificação calculado a partir dos parâmetros da curva analítica pode ser obtido segundo a Equação 10, sendo que concentração correspondente ao

limite deve estar dentro da faixa da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004).

Equação 10: Determinação de limite de quantificação

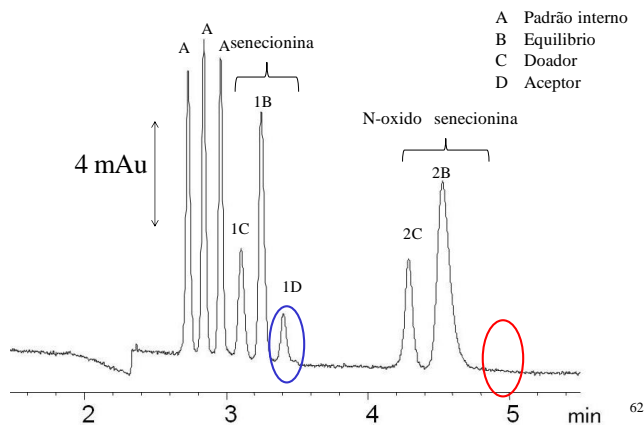
$$LQ = 10 x \frac{s}{S}$$

Onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva de calibração.

c) Aplicação da Metodologia desenvolvida

A Figura 29 demonstra o eletroferograma do experimento de permeabilidade após o tempo de incubação. É possível observar que a senecionina[1] permeia pela membrana resultado evidenciado pelo pico 4A e na sua forma N-óxido senecionina[2] não houve permeação, evidenciado pela ausência do pico 4b. Os dados obtidos para a permeabilidade em membrana assim, como os dados de interação com membrana humana vem concordam com os dados de coeficiente de partição.

Figura 29: Eletroferograma obtido usando múltiplas injeções para a determinação dos analitos nas soluções doadora, aceptora e equilíbrio



Na Tabela 9 são apresentados os dados de constante de permeabilidade e retenção na membrana para ambos os compostos utilizando-se as equações 1 e 2.

Tabela 8: Resultados de permeabilidade dos alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] isolados a partir da espécie *S. brasiliensis*

Composto	<i>P_{app}</i>	<i>RM</i> (%)
senecionina	1,15E-05	14,16
N-óxido senecionina	0	0

***DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
ALCALÓIDES SENECONINA [1] E N-OXIDO
SENECONINA [2] EM AMOSTRAS DE MEL POR
TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-MS)***

De uma maneira geral, os alcalóides pirrolizidínicos são determinados por técnicas cromatográficas usando CG-MS e LC-MS devido a sua sensibilidade e especificidade (Lin *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2004; Wuilloud *et al.*, 2004; Colegate *et al.*, 2005; Mroczek *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). No entanto, análises utilizando CG-MS não são muito adequadas na determinação dos alcalóides pirrolizidínicos devido à instabilidade térmica destas moléculas. Para este tipo de análise, se faz necessário um processo de pré-redução do grupo N-óxido na molécula, seguido por uma derivatização. Sendo assim, em nosso estudo foi utilizado método LC-MS.

Os alcalóides pirrolizidínicos são de natureza básica, relativamente polar, são bastante solúveis em solventes orgânicos, tais como metanol e também são solúveis em soluções aquosas ácidas. Em geral, são extraídos de amostras de mel com solventes clorados como

clorofórmio e diclorometano (Deinzer *et al.*, 1977; Culvenor, Edgar e Smith, 1981). O extrato aquoso ou metanólico geralmente requer clean-up para ser analisado por técnicas cromatográficas.

A maneira clássica para a realização do clean-up nas amostras é através da dissolução do extrato em água acidulada com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico e posterior lavagem com solvente orgânico, tais como éter etílico ou clorofórmio para a remoção do material menos polar.

Técnicas de extração em fase sólida têm sido baseadas em uma coluna comercialmente disponíveis, tais como ChemElut (Betz *et al.*, 1994) ou Extrelut (Hartmann e Toppel, 1987; Crews, Startin e Clarke, 1997), e colunas apolares C18 ou C8.

Outra abordagem na determinação de alcalóides pirrolizidínicos em amostras de mel foi demonstrada por Kempf e colaboradores (Kempf *et al.*, 2010), onde o autor usou o método Quechers –SPE na preparação de amostras para análises em CG/MS e HPLC/MS/MS e comparou os dois procedimentos. Ambos os procedimentos demonstraram-se bastante demorados, sendo 10 e 3 horas de análises total, respectivamente.

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método por HPLC, utilizamos o procedimento de large

volume injection (LVI). Neste procedimento que pode se modificar ou não o hardware do equipamento, é injetado um volume maior que 10 vezes o usual. Procedimentos de large volume injection (LVI-HPLC) em HPLC são utilizados diferentes estratégias para aumentar a retenção dos analitos na coluna, dentre estas podemos citar diluição com água ou utilização de solventes imiscíveis com a fase móvel (Sârbu *et al.*, 2012), ou ainda através da manipulação de pH e adição de aditivos ao solvente da amostra. Na literatura são reportados alguns trabalhos com o uso do método LVI-HPLC na determinação de drogas ilícitas em águas (Berset, Brenneisen e Mathieu, 2010), nitrofenóis (Nagai *et al.*, 2013), produtos químicos fluorados (Backe, Day e Field, 2013). Estes dados demonstram que LVI-HPLC é uma técnica bastante útil na redução ou eliminação de etapas no preparo das amostras complexas.

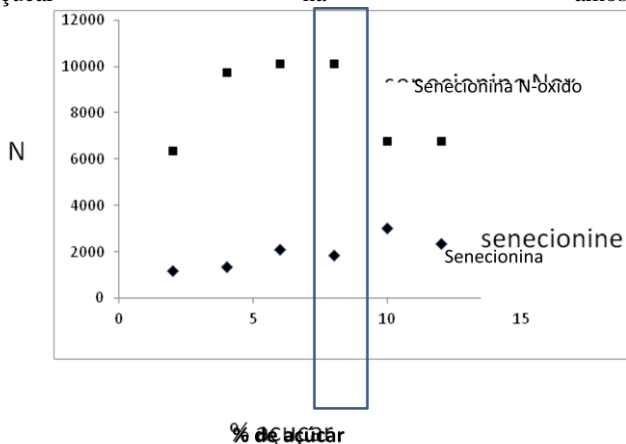
Desta forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia rápida e eficaz utilizando LVI- HPLC/MS/MS por injeção direta da amostra para a determinação de alcalóides pirrolizidínicos em mel de origem comercial. A presente metodologia buscou o uso de matéria prima bruta, sem *Clean up* habitual de outras metodologias.

Para desenvolver um método rápido e de fácil preparo de amostra foram inicialmente testados a porcentagem de açúcar presente na amostra e o volume de injeção.

Porcentagem de açúcar

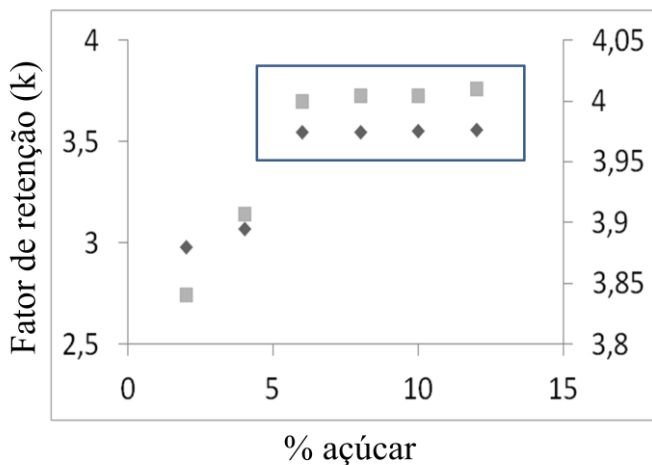
Para medir a porcentagem de açúcar, foi preparada uma solução aquosa contendo frutose (35% w/w) e glicose 35% w/w) a fim de mimetizar a matriz do mel. A partir desta solução foram preparadas soluções contendo, 2, 4, 6, 8, 10 e 12% de açúcar. Foi adicionado a estas soluções 50 µg/Kg dos padrões de senecionina [1] e N-óxido senecionina[2]. As soluções foram injetadas usando um volume de 10 µL. Na Figura 30 são apresentados os valores de eficiência obtidos para cada injeção.

Figura 30: Gráfico de eficiência em função da porcentagem de açúcar na amostra



Pode-se observar que à medida que a porcentagem de açúcar presente na amostra é aumentada, há um aumento na eficiência até um valor de aproximadamente 8 % (+ ou -). No entanto, acima desta porcentagem a eficiência diminui, sendo assim foi escolhido o uso de 8% da porcentagem de açúcar nos experimentos seguintes. Também foi observado que o fator de retenção para ambos os analitos variou com o aumento da porcentagem de açúcar presente na amostra, de forma que foi atingido um platô, conforme pode ser observado na Figura 31, o que vem a confirmar que a porcentagem ideal para a separação dos analitos é de 8% .

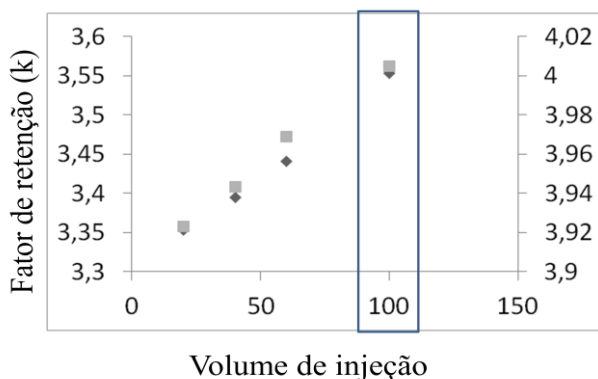
Figura 31: Gráfico de análise do fator de retenção com aumento de porcentagem de açúcar na amostra



Otimização do volume de injeção

Utilizando-se a solução contendo 8% de açúcar, o próximo passo foi variar o volume de injeção de 20 – 100 μL . Para avaliação dos resultados obtidos foi calculado o valor do fator de retenção para cada volume injetado, esperando-se que a medida do fator de retenção reflita na retenção dos analitos no início da coluna. Na figura 32 é apresentado o gráfico obtido.

Figura 32: Gráfico de análise do fator de retenção com aumento de volume de injeção



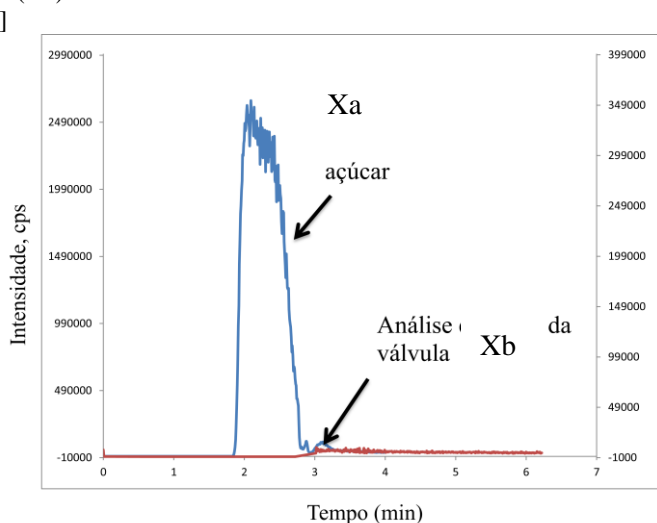
Podemos observar que à medida que se aumenta o volume de injeção, ocorre uma maior retenção dos analitos evidenciado pelo aumento de k . O valor de t_0 permanece praticamente constante em todos os experimentos. Sendo assim, escolhemos o volume de injeção de 100 μL para as análises.

Avaliação do tempo necessário para remover os açúcares presentes na amostra.

Um problema comum em análises de matrizes com grande porcentagem de açúcar é a caramelização da fonte, deste modo com a finalidade de determinar o tempo necessário para remover os açúcares presentes na matriz, e com isso evitar a caramelização na fonte ESI, foi injetada

uma amostra contendo 1 % de açúcares, onde na Figura 33 são apresentados dois cromatogramas, onde em Xa como sendo a análise no modo negativo para a transição de 179-89, sem a utilização do procedimento de remoção do açúcar e o Xb quando se utiliza a válvula de descarte.

Figura 33: Figura (Xa) cromatograma da análise em modo negativo sem a utilização do procedimento de remoção do açúcar e (Xb) com a válvula de descarte



Podemos observar que o tempo de retenção dos açúcares é de três minutos, sendo assim utilizando a válvula de descarte que foi possível remover grande parte

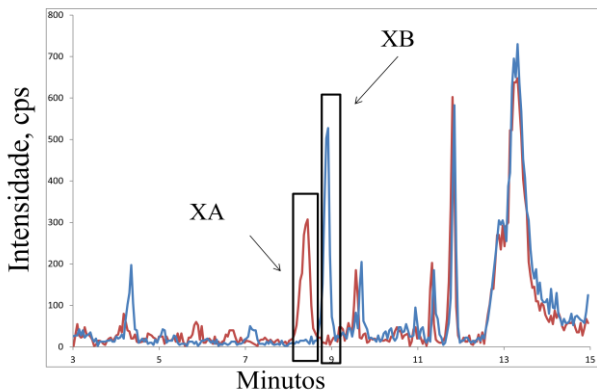
dos açúcares antes que estes chegassem à fonte ESI. Desta forma, ficou definido como 3 minutos o tempo necessário para o acionamento da válvula de descarte e portando a remoção dos contaminantes apolares da matriz.

Efeito do pH no fator de retenção dos analitos

Definidas a porcentagem de açúcar (8%) e o volume de injeção (100 µL) foi então estudado o efeito da mudança de pH da matriz da amostra. Na Figura 34 são apresentados os resultados obtidos para os estudos propostos.

Na Figura 34,XA é apresentado o cromatograma de uma amostra de mel sem ajuste de pH (pH 6.43), e em 34,XB é apresentado o cromatograma de uma amostra de mel com pH ajustado para 10 com hidróxido de amônio. Pode-se observar que a retenção aumenta com aumento do pH, bem como a eficiência. Isso está de acordo com o pKa da senecionina [1] presente na amostra, que é em torno de 8. Os demais componentes da amostra não sofrem variação significativa na retenção indicando assim, que são compostos ácidos.

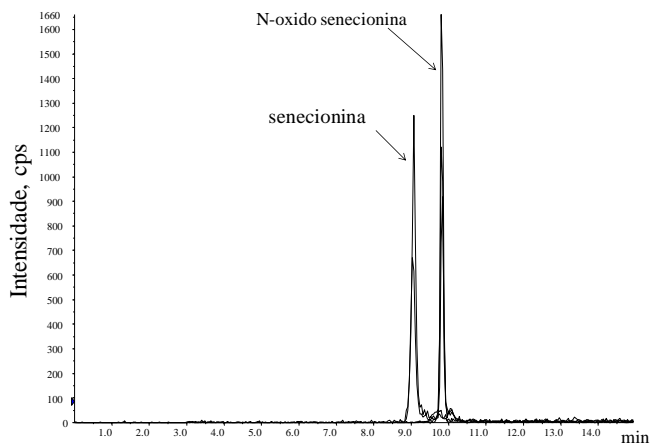
Figura 34: Cromatograma XA amostra de mel sem ajuste de pH (pH 6.43), Cromatograma XB amostra de mel com ajuste de pH (pH = 10)



Validação cromatográfica

A Figura 35 é apresentada um cromatograma da mistura de padrões em uma concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade foi testada com 10 níveis de concentração variando de 200 e 2000 ng L^{-1} . Cada nível de concentração foi preparado em duplicata e injetado em duplicata. As soluções padrão foram preparadas de modo a conter 8% de monossacarídeos a fim de se mimetizar a matriz da amostra de mel.

Figura 35: Cromatograma de padrões em $1 \mu\text{g L}^{-1}$



A equação de regressão linear obtida e o coeficiente de correlação foram de 0.9972 e 0.9966 para senecionina[1] e senecionina N-oxido [2] (Tabela 9).

Tabela 9: Curva de calibração para o método proposto para determinação de alcalóides em mel.

Amostras	senecionina[1]		Senecionina N-oxido [2]	
	Area	DP	Area	DP
a	9.7	0.2	6.07	0.144
b	1432.3	283.2	770.4	192.7
F	2107		1786	
R ²	0.9972		0.9966	

A precisão instrumental do tempo de retenção e a área dos picos foram de 0.65 e 7.1% RSD, respectivamente

(n=5). O valor de RSD para repetibilidade (precisão intra-day, n=3) do tempo de retenção e área do pico foram maior que 0.95 e 9.7%, respectivamente. O limite de detecção (LD) do método para determinação de senecionina[1] e N-oxido senecionina[2] e as condições otimizadas foram de $57 \pm 16 \text{ ng kg}^{-1}$ e $59 \pm 18 \text{ ng kg}^{-1}$ (relação sinal ruído de três). O limite de quantificação (LQ) foi de $188 \pm 12 \text{ ng kg}^{-1}$ e $195 \pm 14 \text{ ng kg}^{-1}$ (relação sinal ruído de 10). Em experimentos de recuperação para senecionina [1] e N-oxido senecionina[2] foi determinada e avaliada a exatidão do método. Sendo os resultados obtidos de 123.0 e 83.4% para adição de 4,8 e $8 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente.

Aplicações do método

O método proposto foi utilizado para analisar 7 diferentes amostras de mel, sendo duas de marca comercial, adquiridas no mercado local (A e B) e 5 fornecidas pelo laboratório de ciências de alimentos, CCA UFSC (nomeadas de z). Através das análises efetuadas, foi possível determinar senecionina[1] em todas as amostras em concentrações que variaram de <LOQ a $1071.3 \pm 64 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Figura 36). De todas as amostras analisadas, somente duas apresentaram N-oxido senecionina[2]

(Figura 36, Tabela 10). Tendo em vista, que a forma N-oxido é o primeiro produto da biossíntese dos alcalóides pirrolizidínicos (Hartmann e Toppel, 1987), foi possível inferir que a senecionina[1] presente no mel seja proveniente de uma reação de redução mediada por constituintes do mel, ou ainda por processos de manufatura.

Figura 36: Cromatograma de amostra de mel contendo alcalóides senecionina [1] e N-oxido senecionina [2]

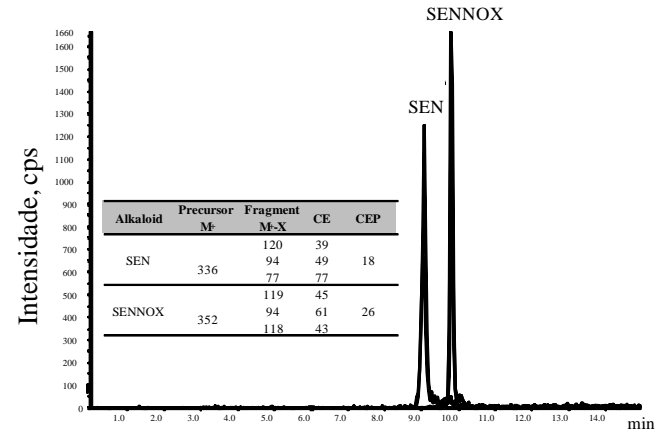
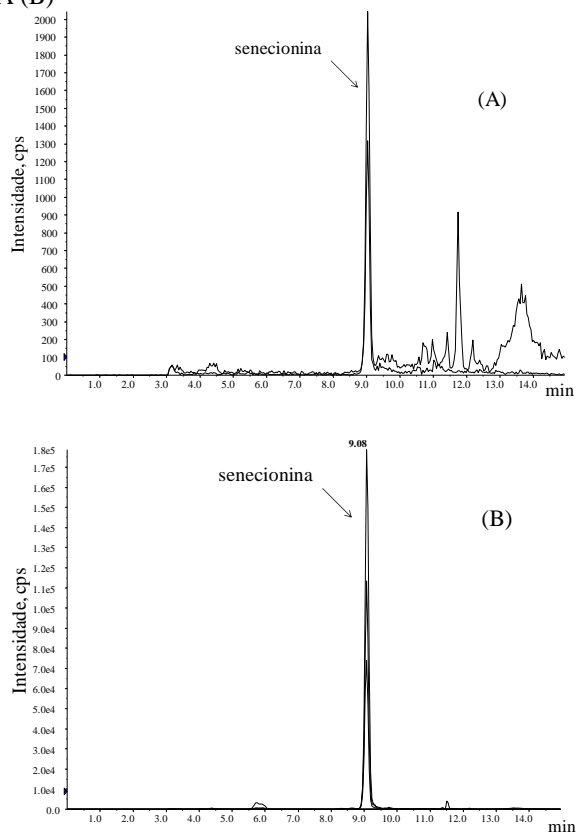


Tabela 10: Dados de quantificação (em $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) de alcalóides senecionina[1] e N-oxido senecionina [2] presente em amostras de mel

Amostras	Senecionina	DP	N-oxido Senecionina	DP
z1	1.9	0.1		
z3	< LOQ			
z5	9.8	1.3		
z6	7.0	1.0	16.9	2.1
z10	< LOQ		2.3	0.3
A	19.7	1.6		

tabela 10 continuação		
b	9.1	1.2
z8	1071.3	64.8

Figura 37: Análise de alcalóides pirrolizidinico senecionina[1] presente em amostras de mel: comercial (A) e fornecidos pela CCA (B)



5. Conclusões

O screening obtido através dos dados de EC para o extrato bruto revelou a presença máxima de constituintes químicos da espécie *S. brasiliensis*, e indicaram que é nas flores onde reside a maior concentração de compostos, o que levou a escolha da flor para estudos fitoquímicos. Vale salientar que a presença dos compostos fenólicos em *S. brasiliensis* não foi descrito na literatura, até o momento.

A EC direcionou um screening para o isolamento de compostos específicos. A resposta para os compostos alcaloídicos foi necessária para determinar relativamente quantos compostos estavam presentes em todas as partes da planta estudada. No entanto, de acordo com a orientação dos dados obtidos por eletroforese capilar e baseado em conhecimentos prévios dos compostos em questão, somente as frações acetato de etila, rica em alcalóides e a aquosa foram avaliadas para a determinação dos compostos presentes na planta. No entanto, apenas a fração rica em alcalóides foi escolhida para o isolamento, caracterização e posteriores análises físico-químicas, visto que os alcalóides presentes na espécie *S. brasiliensis*, são apontados na planta como promotores de toxicidade, e sendo assim passaram a ser o foco do estudo de propriedades.

A determinação e caracterização dos compostos presentes na planta demonstrou que a espécie *Senecio brasiliensis* possui em sua constituição química alcalóides do tipo pirrolizidínicos senecionina[1] e seu derivado N-oxido senecionina [2], compostos fenólicos do tipo flavonóides rutina[7] e quercetrina[8] e ácidos cafeiolquínico di-substituído[3-6].

Partindo do isolamento e caracterização dos compostos presentes na planta, o próximo passo foi determinar sua mobilidade e pKa. E com o auxílio da técnica de eletroforese capilar foi possível determinar a mobilidade iônica e o pKa dos compostos senecionina[1] ($23 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ e 8,3) e N-oxido senecionina[2] ($3,9$ e $22 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), encontrados na espécie *Senecio brasiliensis*, bem como determinar a concentração destes compostos na planta. O método utilizado foi obtido através de uma abordagem sistemática utilizando um número mínimo de experimentos, apenas duas corridas eletroforéticas. A otimização do eletrólito de corrida foi possível com o auxílio do software Peakmaster, o que auxiliou na construção da curva de mobilidade. Em relação a concentração dos compostos na planta foi possível observar que a espécie *Senecio brasiliensis* possui em sua constituição química a prevalência do alcalóide

pirrolizidinico N-óxido senecionina [2]. Este dado vem corroborar com a literatura. Além disso, foi determinado pela primeira vez o pKa e a mobilidade iônica dos alcalóides pirrolizidínicos senecionina[1] e N-óxido senecionina[2]. Este dado foi de grande importância para os procedimentos posteriores.

Quanto às propriedades físico-químicas, na determinação de log P o modelo utilizado abrangeu uma faixa de log P de 0,4 - 4,08. Estes valores foram considerados como o coeficiente de partição mínimo e máximo na determinação. A senecionina [1] apresentou um valor de K de 0,5 logo um valor de log P de 0,7, sendo a senecionina um composto passível de ser carregado pelo meio micelar, e portando capaz de chegar à membrana celular. Para o N-óxido senecionina [2] o valor de log P ficou menor de 0,4, e desta forma este composto não terá capacidade de ser transportado até a membrana biológica, desta forma será excretado do corpo.

Quanto à interação proteína-alcalóides, foi utilizado um modelo PF_ACE (partial filling affinity capillary electrophoresis), com a intenção de se observar alguma interação entre a albumina humana e os alcalóides pirrolizidínicos senecionina [1] e N-óxido senecionina [2]. No entanto, o modelo utilizado não foi conclusivo, não

sendo observada nenhuma interação entre a proteína e os alcalóides estudados.

No ensaio de PAMPA, foi utilizada técnica convencional na determinação da permeabilidade dos compostos através da membrana, utilizando EC na análise dos compartimentos equilíbrio, acceptor e doador. Esta análise foi efetuada usando técnica de injeção múltipla, onde são realizadas análises em tempo menor do que o usual, dos três compartimentos simultaneamente, sendo possível em uma única análise para determinar a capacidade de permeabilidade de mais de um composto. Para tal método, foi calculado um número máximo de injeções com a finalidade de se obter quantas amostras fossem passíveis de ser analisadas. Baseado nos dados eletroforéticos, foi possível determinar que o alcalóide senecionina [1] possui uma constante de permeabilidade (P_{app}) de $1,1 \times 10^{-5}$ e uma porcentagem de retenção da membrana (RM) de 14,16 %, enquanto que o N-óxido senecionina [2] não apresentou permeabilidade na membrana. Estes resultados concordam com os obtidos a partir dos dados de coeficiente de partição, visto que o N-óxido tendo um coeficiente de partição menor que 0,4, menor será sua capacidade de ser carregado pelo sistema biológico e desta forma, de transpor a membrana

biológica, por outro lado o alcalóide senecionina [1] é um composto capaz de ser carregado e de transpor a membrana biológica.

Levando em conta que os alcalóides pirrolizidínicos são potencialmente tóxicos e que, a senecionina possui capacidade de transpor a membrana biológica, foi então efetuado análises com auxílio de LC/MS in LVI na determinação de alcalóides senecionina [1] e N-óxido senecionina [2] em amostras de mel. Foi demonstrado que o alcalóide senecionina[1] está presente em quase todos os tipos de mel, em concentrações que variaram de <LOQ a 1071.3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. De todas as amostras analisadas, somente duas apresentaram N-óxido senecionina [2]. Tendo em vista, que a forma N-óxido é o primeiro produto da biossíntese dos alcalóides pirrolizidínicos, é possível inferir que a senecionina[1] presente no mel seja proveniente de uma reação de redução mediada por constituintes do mel, ou ainda por processos de manufatura.

Considerando que o limite estabelecido para este alcalóide na dieta diária é de 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$, os valores encontrados nas amostras de mel são considerados de risco para a saúde humana. Os resultados obtidos demonstraram grande importância no monitoramento dos níveis dos

alcalóides pirrolizidínicos em mel, mesmo porque este produto faz parte da mesa de quase todas as pessoas, sendo considerado um alimento saudável. No entanto, trata-se de um potencial risco para a saúde de quem o consome.

6. Metodologias

METODOLOGIA PARA EXPERIMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR COMO GUIA NO ISOLAMENTO FITOQUÍMICO

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas usando reagentes de grau analítico e água deionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA). Metanol foi adquirido a partir da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). O hidróxido de sódio usado para condicionar o capilar foi obtido a partir da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A β -alanina, ácido perclórico, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), 2-amino-2-hidroximetil-propane-1,3-diol (TRIS), ácido 2-(*N*-morpholino) etanesulfônico (MES), tetraborado de sódio (STB), quercetina, ácido 3-cafeoilquínico, 4-nitrofenol, e ácido fórmico foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). Os ácidos ferulico, cafeico, *p*-coumarico, valínico, siringico, *p*-anísico e sinápinico foram também adquiridos através da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). Todos os solventes e reagentes usados no processo de extração (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , acetato de etila, etanol, hexano, MeOH, NH_4OH e NaOH) foram adquiridos através de Synth (São

Paulo, SP, Brazil), e a acetonitrila da Tedia Brazil (São Paulo, SP, Brazil).

Obtenção da planta e preparo do extrato bruto

A espécie *Senecio brasiliensis* foi coletada em campo de pastagem em uma propriedade rural localizada no 3º Distrito de Jaguarão, Rio Grande do Sul. A coleta foi efetuada em época de inflorescência (Outubro 2010), onde foi possível coletar todas as partes da planta a ser estudada fitoquimicamente.

O extrato bruto foi obtido a partir de 1.5 kg de cada parte da planta previamente seca em circulação de ar a 30°C durante três dias. Após esse período o material vegetal foi macerado em etanol por sete dias, o solvente resultante foi removido a pressão reduzida, rendendo aproximadamente 300g de extrato bruto das flores, folhas e caule, em um total de 900 g de extrato bruto.

Sistema de eletroforese capilar

O equipamento usado foi CE system modelo HP 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com DAD e HP ChemStation software para o controle, processamento e aquisição de dados. Foi usado um capilar

de sílica fundida de polyimide (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com dimensões de comprimento total de 48.5 cm e 8.5 cm de comprimento efetivo (50 μm i.d., 375 μm o.d.), as injeções foram efetuadas de maneira heterodinâmica por aplicação de pressão de 50 mbar/5 s com polaridade positiva, e a temperatura do cartucho foi mantida a 25 °C durante todos os procedimentos.

O condicionamento dos capilares foram efetuados através de lavagem com solução de 1.0 mol L⁻¹ de NaOH (30 min), seguido por água (30 min) e BGE (20 min). Entre cada corrida, o capilar é lavado por 1.0 min com BGE específico.

As respostas dos picos foram monitoradas baseadas na máxima absorção dos analitos sob as condições experimentais, sendo: 215 nm para alcalóides, 250 nm e 315 nm para compostos fenólicos e 350 nm e 390 nm para flavonóides.

Preparação das soluções padrões e amostras para EC

Os padrões foram preparados individualmente dissolvendo 25 mg em 25 mL de MeOH/água (80:20, v/v). As soluções estoque das amostras (extrato bruto) da *Senecio brasiliensis* foram preparados pela dissolução de 10 mg em 10 mL de MeOH:água (80:20, v/v).

Condições eletroforéticas para screening fitoquímico

a) *Determinação de alcalóides:* para a determinação de alcalóides o BGE usado foi composto por 20 mM β -alanina, 10 mM ácido perclórico, e 60 mM de HP- β -CD em pH 3.5. A voltagem aplicada para eletroforese foi de 20 kV, e polaridade positiva.

b) *Determinação de compostos fenólicos:* para a determinação de compostos fenólicos o BGE usado foi composto por 20 mM TRIS e 40 mM MES, na qual foram tamponado em pH 6.5. Foi aplicada uma voltagem de 25 Kv para a separação eletroforética e usado polaridade positiva.

c) *Determinação de flavonoides:* para a determinação de flavonoides o BGE usados foi composto por 20 mM de STB e 20% metanol (v/v). Esta solução foi tamponada em pH de 9.3. As injeções foram efetuadas por aplicação de pressão 50 mbar/5 s sob polaridade positiva, e voltagem de +30 kV. Os analitos foram conduzidos antes e depois da hidrolise. O procedimento de hidrolise começa com a adição de 200 μ L de HCl 8.0 M em uma solução contendo 50 μ L do extrato bruto em 500 μ L de água. Esta mistura ficou aquecendo a 100 °C por 1 h, após esse período a

temperatura reacional foi reduzida e então foram adicionados 2.0 mL de acetato de etila. Desta mistura foi coletado um mililitro da fase orgânica, e esta foi seca sobre vácuo. O sólido resultante foi dissolvido em 1.5 mL de uma solução MeOH:água (67/33, v/v), e esta solução foi então injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Isolamento fitoquímico

Alcalóides

O procedimento de isolamento de alcalóides baseia-se em uma extração ácido- base, partindo de 50 g de extrato bruto dissolvido em 100 mL de uma solução 15% etanol em pH 2 (ajustado com HCl). Nesta faixa de pH os alcalóides ficam protonados e permanecem na água, após a extração com acetato de etila para a retirada de todos os compostos não alcaloídicos, o pH é ajustado para 12 com NaOH, e então a fração alcaloídica é obtida por extração com acetato de etila (2x200 mL). Esta fração foi sujeita a separação cromatográfica em sílica com mistura gradiente de CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (85:14:1). Desta separação se obteve três compostos, o qual foram analisados e

caracterizados por outras técnicas de caracterização (HPLC-DAD-MS/MS, RMN ^1H , ^{13}C e IV).

Compostos fenólicos (flavonoides e compostos fenólicos)

Para a obtenção dos compostos fenólicos foi utilizada procedimento extração líquido-líquido (LLE) com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila). Partindo de 50 g de extrato bruto dissolvido em 100 mL de uma solução 15% de etanol. Esta mistura foi extraída com 200 mL de cada solvente específico, e este processo foi repetido por três vezes para separar todos os compostos com diferentes polaridades, resultando nas frações: hexano (apolar), diclorometano (polaridade intermediária), acetato de etila (polar) e a fração aquosa. Este procedimento é bastante comum em análises fitoquímicas, no entanto, de acordo com a orientação da eletroforese capilar e baseado em prévios conhecimentos destes compostos, apenas as frações acetato de etila foram cromatografadas para a separação dos compostos fenólicos. Os compostos separados por cromatografia foram confirmados por HPLC-DAD-MS/MS.

Sistema HPLC-DAD-MS/MS

A confirmação do método usando análise HPLC-DAD-MS/MS foi efetuada em equipamento de Cromatografia líquida de alta eficiência (high-performance liquid chromatography - HPLC) modelo Agilent Technologies 1200 – Germany. A separação foi efetuada através de coluna fase reversa Phenomenex Synergi (150 mm, 2.1 mm i.d., 3.0 µm particle size). A temperatura do forno foi de 30 °C. o sistema HPLC é acoplado a um espectrômetro de massa que consiste em um híbrido triplo quadrupolo/linear ion trap mass spectrometer QTrap 3200TM (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). O software Analyst version 1.5.1 foi usado para aquisição e controle de dados do LC/MS/MS. O espectrômetro de massa foi ajustado nos modos negativo e positivo para infusão de amostras em solução. Os experimentos foram realizados usando fonte TurboIonSprayTM (ionização eletrospray) no modo positivo e negativo. Para as condições atmosféricas foi usado gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2), e gás exaustor da fonte, e nitrogênio foi usado como “curtain gás” e gás de colisão (CAD gás). A voltagem do capilar foi mantida em 4500 V e -4500 V para detectar cátions e ânions, respectivamente. Os parâmetros de MS/MS consistem em:

curtain gas, 10 psi; temperatura, 450 °C; GS1, 45 psi; GS2, 45 psi; e CAD gas, medium. A fase móvel foi igual para todos os experimentos em HPLC-DAD-MS/MS: fase móvel A (H₂O + 0.1% ácido fórmico) e B (95:5 acetonitrila/ H₂O + 0.1% ácido fórmico).

Condições para identificação estrutural - HPLC-DAD-MS/MS

a) *Identificação de Alcalóides:* Para a identificação dos alcalóides, os espectros de massa foram obtidos por infusão direta de 10 µL min⁻¹ de uma solução preparada de 1 µg mL⁻¹ de cada alcalóide isolado. O espectrômetro de massa foi operado no modo positivo. Os experimentos foram realizados em modo EPI (enhanced product ion) com uma voltagem de capilar de 4500 V e uma temperatura de 450 °C. A energia de colisão (CE) usada foi de 20 V, e o declustering potential (DP) e entrance potential (EP) foi de 50 V e 30 V, respectivamente.

b) *Identificação de compostos fenólicos :* A separação dos compostos fenólicos foi realizada com o seguinte gradiente: 0-1 min, 20% solvente B; 1-5 min, aumentando para 95% de solvente B, e 5-15 min, permaneceu em 95% de solvente B. O fluxo utilizado foi de 0.2 mL min⁻¹, e a

temperatura do forno foi de 30 °C. Durante todo o processo foi utilizado multipassos e gradiente linear, e o volume de injeção foi de 10 µL. o espectrômetro de massa foi operado no modo negativo. Os experimentos usados foram MS1 (Q1 MS), MS2, e MS3. Para o experimento em MS3 os parâmetros usados foram: DP= -35 V, EP= -10 V, CE= -10 V, e CEP = -31 V. A transição do MS3 de 356>353 e 353>336 foi monitorada. O volume de AFN foi de 100, o Q3 entry barrier foi de 8.00 V, e o tempo de excitação foi de 100 msec. Para o experimento MS1 os parâmetros usados foram: DP = -35 V e EP = -10 V, e para o experimento MS2 os parâmetros usados foram os mesmos do MS1 com a adição de CE = -10 V. A DP e EP foram as mesmas nos experimentos MS1, MS2, e MS3.

a) ***Identificação de flavonoides:***As condições usadas no experimento HPLC as mesmas usadas para a identificação dos compostos fenólicos. O espectrômetro de massa foi operado no modo negativo. Para a identificação dos flavonoides foi usado o experimento modo EMS1 (enhanced mass spectra) com uma voltagem capilar de -4500 V, temperatura de 450 °C, DP = -35 V, e EP = -5 V.

Sistema de Infravermelho

Para a análise de infravermelho, foi utilizado equipamento marca e modelo FT-16PC. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

Sistema CG/MS

As análises de CG/MS foram realizadas em um equipamento Agilent technologies 5975 series MSD, acoplada a um sistema GC 7820A. Seguindo os parâmetros de programação do forno: tempo de equilíbrio de 0.1 min, temperatura máxima de 350 °C, rampa de aquecimento: temperatura inicial de 80 °C por 1 min, depois 10 °C/min até 280 °C, permanece por 5 min. Tempo total de corrida 26 min. Fluxo de 6 mL/min, gás de arraste: He; Gas Saver 20 mL/min após 2 min, pressão de 7 psi; temperatura do inlet 250°C; temperatura MSD: ponto de ajuste quad 150; ponto de referencia 230. Velocidade média de 40 cm/seg; tempo holdup 1,029 min; Coluna HP5, 425 °C (25 m x 250 µm x 0.25 µm). Injeção de 1 µL, modo split, taxa de split foi de 5:1.

Modo de aquisição Scan/SIM parâmetros: tempo inicial 5; massa menor 100; massa maior 900; limite 150; MS fonte: 230 °C, máximo 250 °C; MS Quad:150 °C, máximo 200 °C, delay do solvente 5 min, energia de

ionização por elétron de 70 eV; taxa do scan de 1992.000;
Plot 2 baixa massa: 50.0, alta massa: 550.0.

Sistema de RMN

Uma última análise a fim de determinar estruturalmente os compostos isolados foi de ressonância magnética nuclear de H^1 , C^{13} , DEPT, HMBC e HMQC. Estas análises foram obtidas utilizando-se espectrômetros Varian Oxford AS-400, operando na frequência do hidrogênio-1 a 400 MHz, e na frequência do carbono-13 a 100 MHz, respectivamente, e para as análises preliminares de hidrogênio foi utilizado equipamento da marca e modelo Bruker AC 200F. As dissoluções das amostras foram efetuadas com solvente deuterado clorofórmio ($CDCl_3$).

Determinação de pKa e mobilidade iônica dos alcalóides pirrolizidínicos. Quantificação da senecionina [1] e N-óxido senecionina[2] nos extratos da flor e folha da espécie Senecio brasiliensis.

Materiais e métodos

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. O hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos por Merck(Darmstadt,Germany). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), histidina, ácido fórmico e b-alanina foram adquiridos a partir da empresa Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). as soluções foram preparadas em água deionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). A solução estoque (1000 mg L^{-1}) dos padrões de senecionina e senecionina N-óxido foram preparadas em MeOH e guardadas sob refrigeração à 4°C . O padrões de senecionina e N-óxido nas concentrações 25 a 125 mg L^{-1} foram preparadas a partir da solução estoque. O eletrólito (BGE) foi preparado a partir da solução estoque de b-alanina e ácido fórmico, ambos em 100 mmol L^{-1} . O

eletrólito otimizado foi composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e 57 mmol L⁻¹ de b-alanina, em pH 4.0.

Obtenção do extrato

O extrato foi preparado a partir das folhas e flores frescas, colocados em 1 mL de uma solução 50% MeOH:H₂O (v/v). Esta mistura foi sonicada por 40 minutos. Após esse período, o extrato foi filtrado e estocado para análise. A massa média das flores foi de 84±5 mg (n=5) e das folhas foi de 255±90 mg (n=5).

Sistema eletroforese capilar

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar Agilent Technologies, modelo 7100 (Palo Alto, C.A., U.S.A), equipado com detector DAD (diode-array detector) e software Agilent ChemStation. A temperatura interna do cartucho foi mantida a 25 °C e o capilar usado foi de sílica fundida com poliimida com dimensões de 48,50 com de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo, 50 µm D.I x 375 µm D.E. (Polymicro Technologies (Phoenix, the U.S.A).

Condições eletroforéticas.

O primeiro condicionamento do capilar foi a uma temperatura de 25 °C com 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹, 30 minutos com água deionizada e 20 minutos com o eletrólito. O condicionamento entre as análises foi de 1 minuto com o eletrólito.

A solução padrão e as amostras foram injetadas de modo hidrodinâmico com uma pressão de 50 mbar por 6 s. a separação dos analitos foi efetuada sob a aplicação de campo elétrico de 25 kV, com polaridade positiva. A detecção direta foi realizada com UV/VIS monitorada em 200 nm e 380 nm, bw 4 de referencia.

Determinação da mobilidade iônica

Para a determinação da mobilidade iônica o BGE usado foi compostos por Tris 2 mmol L⁻¹ e o pH foi ajustado em 2.1 usando HCl 1 mol L⁻¹. A mobilidade iônica foi determinada através do procedimento Williams e Vigh (Williams, 1996) e como marcador neutro foi utilizada acetona. O t_{migr} usado foi 40 s, t_d 1s, $t_{ramp\ up}$ 12s e $t_{ramp-down}$ 1s. O tempo utilizado para introduzir o analito na região termostatzada do capilar foi de 60s e o tempo de

injeção foi de 3s á 50 mBar. Este procedimento foi utilizado em todos os passos do experimento.

Determinação do pKa

Para a determinação do pKa foi utilizado o mesmo procedimento descrito na seção anterior, com troca apenas do eletrólito de corrida. Onde em pH 4.2, o BGE foi composto por tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 20 mmol L⁻¹ e ácido 2-hidroxiisobutírico, (HIBA) 30 mmol L⁻¹; em pH 5.3 o BGE foi compostos por ácido acético 25 mmol L⁻¹ e Tris 20 mmol L⁻¹ e em pH 7 o BGE foi compostos por ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico 20 mmol L⁻¹ (MES) e Tris 20 mmol L⁻¹.

Determinação de coeficiente de partição log p por eletroforese capilar

Parte experimental

Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Metanol, acetona, hidróxido de sódio, tetraborato

de sódio, são da marca Merck (Darmstadt, Germany). Deoxicolato de sódio, cimetidina, trimetoprima, diazepam, etinilestradiol, lidocaína, carbamazepina, pireno, fluoxetina, estrona, são de marca Sigma. Água deionizada (deionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, USA) foi utilizada para o preparo das soluções.

As soluções padrões estoque (1000 mg L^{-1}) foram preparadas com metanol armazenada a 4°C , e as diluições foram preparadas diariamente a partir da das soluções estoque. A solução estoque (100 mmol L^{-1}) de tetraborato de sódio (TBS) foi usada para a preparação dos eletrólitos de corrida. O eletrólito de corrida utilizado constituiu-se de TBS 20 mmol L^{-1} e Deoxicolato de sódio 40 mmol L^{-1} .

Equipamentos

As análises foram efetuadas em um equipamento de Eletroforese Capilar da marca Agilent Technologies modelo 7100 (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram executadas a 25°C em capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida ($48,5 \text{ cm} \times 50 \text{ }\mu\text{m D.I.} \times 375 \text{ }\mu\text{m D.E.}$) proveniente da empresa Polymicro. O condicionamento do capilar foi a 25°C de 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} , 30 minutos com água e

20 minutos com o eletrólito de corrida. Entre as corridas o condicionamento foi de 1 minuto com o eletrólito de corrida. Foi utilizada injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 3 s (1psi = 6894.76 Pa). A detecção foi por UV em comprimento de onda de 200 nm. A voltagem aplicada para esta separação foi de 25 KV. Os dados foram adquiridos e tratados com auxílio de software HP Chemstation.

Determinação da permeabilidade em membrana paralela pampa por eletroforese capilar

Ensaio de permeabilidade

Foram utilizada placas de 96 poços. Os filtros foram lavados com 10 µL de uma solução 1% (w/v) de fosfatidilcolina em dodecano. A solução doadora é composta a partir da diluição da solução estoque de analito (1000 mg.mL⁻¹ em DMSO), em 50% de uma solução salina tamponada com fosfato. Esta mistura ficou sob agitação constante por 24 hs. Então, foram adicionados 150 µL da solução doadora nos filtros dos poços, e 300 µL da solução aceptora (50% DMSO/tampão fosfato) na

porção aceptora da placa. O filtro foi então, acoplado na porção aceptora e incubado no escuro por 5 horas sob agitação, e depois 20 min. a temperatura ambiente. Para a obtenção do equilíbrio foram colocados 150 µL da solução doadora em 300 µL da solução aceptora. Para a determinação do pampa, o experimento foi efetuado em quadruplicata. Após este passo do procedimento, as soluções doadoras, aceptoras e equilíbrio foram colocados em vials e analisadas por EC.

A constante de permeabilidade (P_{app}) foi calculada usando a equação 11 proposta por Wohnsland e Faller:

Equação 11: Determinação da constante de permeabilidade

$$P_{app} = \frac{V_D V_A}{(V_D + V_A) A t} (-\ln(1 - r))$$

Onde V_D é o volume da solução doadora (cm^3), V_A é o volume da solução aceptora e A é a área da membrana (cm^2), t é o tempo de incubação (s) e r é razão entre a concentração de compostos no poço aceptador e solução de equilíbrio.

A retenção na membrana pode ser calculada pela equação 12.

Equação 12: Determinação de retenção de membrana

$$RM\% = \frac{(A_{eq} - (A_{ac} + A_{do}))}{A_{eq}} \times 100$$

Onde *RM* é a porcentagem de retenção de um determinado composto na membrana; *Aeq* é a área ou concentração da solução de equilíbrio; *Aac* é a área ou concentração da solução acceptora e *Ado* é a área ou concentração da solução doadora.

A determinação da concentração dos analitos nas soluções doadora, acceptora e equilíbrio podem ser feita por espectrofotometria, HPLC/UV, HPLC/MS. Até o presente momento não foi encontrado na literatura determinações feita por eletroforese capilar CE. Como são necessárias três determinações para os cálculos de Papp e RM uma estratégia interessante é a utilização de injeções múltiplas onde é possível determinar a concentração dos analitos nas três diferentes soluções numa única análise. Na literatura são apresentadas algumas aplicações da estratégia de injeção múltipla em eletroforese capilar (Lodén e Amini, 2007; Amini *et al.*, 2008; Amini, 2013), sendo assim mais uma vez esta técnica se faz muito atrativa na determinação

da constante de permeabilidade utilizando-se injeções múltiplas em CE.

Procedimento experimental utilizando eletroforese capilar

Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados no preparo do tampão são de grau analítico. Hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram obtidos a partir de Merck (Darmstadt, Germany). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), histidina, ácido fórmico e β -alanina foram adquiridos a partir de Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). Água deionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada para preparar as soluções. As soluções de padrão foram preparados em metanol: água a uma concentração de 1000 mg L⁻¹, e estocadas sob refrigeração a 4°C. Os padrões de senecionina e N-óxido senecionina foram diluídos a partir da solução estoque (1000 mg L⁻¹) nas concentrações de 25 á 125 mg L⁻¹. As soluções de β -alanina e ácido fórmico, ambos em 100 mmol L⁻¹, foram usados para o preparo de eletrólito de corrida (BGE). O eletrólito ótimo foi preparado a partir de 20 mmol L⁻¹ de ácido fórmico e 57 mmol L⁻¹ de β -alanina, em pH 4.0.

Instrumentação e procedimento eletroforético.

Os experimentos foram realizados em equipamento Agilent Technologies HP^{3D}CE (Palo Alto, CA, USA), com detector de arranjo de diodo (DAD). O capilar utilizado foi de sílica fundida (32cm x 50µm i.d x 375µm o.d) com 8,5 cm de comprimento efetivo do detector injeção hidrodinâmica (50 mbar, 6 s), 30 kV tensão aplicada; com polaridade negativa, 25 °C e detecção direta em 218 nm. Entre as corridas o capilar foi lavado por 1 min com p BGE.

As soluções e amostras contendo senecionina[1] e N-óxido senecionina[2] foram introduzidas usando múltiplas injeções, este procedimento foi realizado de modo hidrodinâmico sob pressão positiva como segue: 50 mbar/3s (equilíbrio + PI); 50 mbar/6s (doador + PI); 50 mbar/6s (BGE como eletrólito espaçador); 50 mbar/3s (aceptor + PI)

Determinação e quantificação de alcalóides pirrolizidínicos em amostras de mel

As análises LC/MS/MS foi realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC- high-performance liquid chromatography) Agilent Technologies- Germany. A separação dos compostos foi efetuada em coluna de fase reversa RP Synergi (150 mm, 2 mm ID, 4 μ m particle size), com gradiente linear e isocrático (multi-step) de solventes A (H_2O + 0.1% ácido fórmico) e B (95:5 Metanol/ H_2O + 0.1% ácido fórmico). As corridas foram realizadas usando a seguinte programação de gradiente:-8 - 0 minuto 80% solvente A (modo isocrático), 0-1 minuto, 80% solvente A (modo isocrático); 1-5 minutos, 5% solvente A (modo gradiente linear); 5-15 minutos, 5% solvente A (modo isocrático). Fluxo de 0.2 mL/min. Em todos os momentos o volume de injeção foi de 100 μ L. a temperatura da coluna foi de 30 $^{\circ}C$. O sistema LC foi acoplado a espectrometria de massas consistindo de híbrido triploquadrupolo/linear ion trap mass spectrometer QTrap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada) com válvula de via adicional. Os A versão 1.5.1 Analyst foi usada para controle do sistema LC/MS/MS e análise de dados. O espectrômetro de massa foi ajustado nos modos negativos e positivos para a infusão de solução de polipropileno glicol. Os experimentos foram realizados usando TurboIonSprayTM source (electrospray-ESI) no modo íon positivo. A agulha capilar foi mantida em 5500 V. e os parâmetros de MS/MS foram: curtain gás de 10 psi;

temperatura de 400 °C; gas 1 de 45 psi; gas 2 de 45 psi; CAD gas médio. Outros parâmetros de energia de colisão estão listados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Parâmetros MS/MS para senecionina m/z 336 e senecionina N-óxido m/z 352

Precursor	Fragmento	Milisec	DP	EP	CEP	CE	CXP
336	120	400	61	4	18	39	4
336	94	400	61	4	18	49	4
336	77	400	61	4	18	77	4
352	119	400	61	4	26	45	4
352	94	400	61	4	26	61	4
352	118	400	61	4	26	43	4

Os compostos alcaloidicos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de reação múltipla (MRM - multiple reaction monitoring). A otimização do espectrômetro de massa foi realizada por infusão direta de uma solução aquosa contendo analitos a serem investigados. Para a proteção da fonte capilar contra a caramelização do açúcar na amostra, o que atravessa a coluna em 0-3 min é excluído com o auxílio da válvula.

Reagentes e soluções.

Todos os reagentes usados nos experimentos são de grau analítico. O hidróxido de amônio (NH₄OH) e ácido fórmico foram obtidos através de Sigma, O metanol (MeOH) foi adquirido através de Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Para o preparo das amostras e fase

móvel foi utilizada água deionizada (Milli-Q deioniser, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). A solução estoque de padrões (1000 mg L⁻¹) foi preparada em metanol. Os padrões utilizados neste trabalho foram doados do laboratório LQPN, do professor Moacir Pizzolatte.

Curvas de calibração

Para construção das curvas de calibração foi utilizado uma solução aquosa contendo 4% de frutose e 4% de glicose a fim de mimetizar a matriz. As curvas foram construídas em concentrações de 200-2000 ng L⁻¹.

Preparação de amostras

As amostras foram preparadas pesando-se cerca de 1 grama de cada amostra em um frasco de vidro, a este frasco foi adicionado uma massa de água para completar 8 gramas. A mistura foi agitada até completa homogeneização, e o pH da solução foi ajustado em 9.5 com NH₄OH, a amostra assim preparada foi analisada por LC/MS/MS.

7.Referências

ADLARD, M. et al. Rapid estimation of octanol-water partition coefficients using deoxycholate micelles in capillary electrophoresis. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 21, p. 2241-2243, 1995. ISSN 0022-4936. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C39950002241> >.

AMINI, A. Separation of somatropin charge variants by multiple-injection CZE with Polybrene/chondroitin sulfate A double-coated capillaries. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 16, p. 2686-2690, 2013. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201300327> >.

AMINI, A. et al. Principles for different modes of multiple-injection CZE. **ELECTROPHORESIS**, v. 29, n. 19, p. 3952-3958, 2008. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800398> >.

AVDEEF, A. **Absorption and drug development : solubility, permeability, and charge state**. Hoboken, N.J: Wiley, 2012. ISBN 9781118057452 1118057457.

AVDEEF, A.; NIELSEN, P. E.; TSINMAN, O. PAMPA—a drug absorption in vitro model: 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 365-374, 8// 2004. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098704001216> >.

BACKE, W. J.; DAY, T. C.; FIELD, J. A. Zwitterionic, Cationic, and Anionic Fluorinated Chemicals in Aqueous Film Forming Foam Formulations and Groundwater from U.S. Military Bases by Nonaqueous Large-Volume Injection HPLC-MS/MS. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 5226-5234, 2013/05/21 2013. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/es3034999> >. Acesso em: 2014/01/21.

BERSET, J.-D.; BRENNEISEN, R.; MATHIEU, C. Analysis of Illicit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography – Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). **Chemosphere**, v. 81, n. 7, p. 859-866, 11// 2010. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653510008891> >.

BETZ, J. M. et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 5, p. 649-653, 1994. ISSN 1520-6017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600830511> >.

BLOCK, J. H. **Physicochemical properties in relation to biological action**. 10th ed. Philadelphia: 1998.

BOČEK, P. D., M.; GEBAUER, P.; DOLNÍK, V. . **Analytical Isotachophoresis**. VCH, 1988. ISBN

9783527264445. Disponível em: <
<http://books.google.com.br/books?id=anSLAAAAIAAJ>
>.

BRASITUS, T. A.; SCHACHTER, D. Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membranes regional differences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 774, n. 1, p. 138-146, 7/11/ 1984. ISSN 0005-2736. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273684902840> >.

BRAUCHLI, J. L., J.; ZWEIFEL, U.; SCHLATTER, CH Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. **Experientia**, v. 38, n. 9, p. 1085-1087, 1982/09/01 1982. ISSN 0014-4754. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01955382> >.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, n. 0, p. 218-28, 2013. ISSN 0731-7085. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513001179> >.

BRUSOTTI, G. C., I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the

ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 0, 2013. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513001179> >.

CHEMICALIZE.ORG. **Properties viewer**.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P. P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 183-196, 2010. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1504> >.

CLARK, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 8, p. 807-814, 1999. ISSN 1520-6017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/js9804011> >.

CLIFFORD, M. N. K., SUSAN; KUHNERT, NIKOLAI. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821-3832, 2005/05/01 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf050046h> >. Acesso em: 2013/09/19.

COLEGATE, S. M. et al. Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their

N-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 2, p. 108-119, 2005. ISSN 1099-1565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pca.828> >.

COLEGATE, S. M. M., RUSSELL J.; EDGAR, JOHN A.; KNILL, ANDREW M.; LEE, STEPHEN T. Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 2, p. 108-119, 2005. ISSN 1099-1565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pca.828> >.

CONRADIE, J.; STEWART, M. J.; STEENKAMP, V. GC/MS identification of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional remedies given to two sets of twins. **Ann Clin Biochem**, v. 42, n. Pt 2, p. 141-4, Mar 2005. ISSN 0004-5632 (Print)

0004-5632.

COSTA, A. C. O. D. C., JOSÉ LUIZ; TONIN, FERNANDO G.; TAVARES, MARINA F. M.; MICKE, GUSTAVO AMADEU. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, n. 1-2, p. 140-143, 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730701597X> >.

COULOMBE JR, R. A. Pyrrolizidine alkaloids in foods. In: (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**: Academic Press, v. Volume 45, 2003. p.61-99. ISBN 1043-4526.

CREWS, C.; STARTIN, J. R.; CLARKE, P. A. Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 5, p. 419-428, 1997/07/01 1997. ISSN 0265-203X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/02652039709374547> >. Acesso em: 2014/01/21.

CULVENOR, C. C. J.; EDGAR, J. A.; SMITH, L. W. Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 958-960, 1981/09/01 1981. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf00107a018> >. Acesso em: 2014/01/21.

DEINZER, M. L. et al. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). **Science**, v. 195, n. 4277, p. 497-9, Feb 4 1977. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. Second Edition. 2002.

_____. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach Second Edition. ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2002

DREASSI, E. et al. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3712-3717, 9// 2009. ISSN 0223-5234. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409001962> >.

DÜBECKE, A.; BECKH, G.; LÜLLMANN, C. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 3, p. 348-358, 2011/03/01 2011. ISSN 1944-0049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.541594> >. Acesso em: 2014/01/19.

EFSA. **SCIENTIFIC OPINION -Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) European Food Safety Authority - EFSA Journal**. Parma, Italy. 9: 134 p. 2011.

FERNANDES, A. C. R., MARA REJANE A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Bioscience**, v. 7, n. 4, p. 395-439, 2009.

FRANCESCATO, L. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 239-245, 2007. ISSN 1516-9332. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000200010&nrm=iso>.

FREI, H. et al. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 83, n. 1, p. 1-22, 6/15/ 1992. ISSN 0009-2797. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009279792900883>>.

FUGUET, E. et al. Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 17, p. 3646-3651, 4/24/ 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730900020X>>.

GAŠ, B. C., PAVEL; JAROŠ, MICHAL; MUŽIKÁŘ, JAN; JELÍNEK, IVAN. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model. **Journal of Chromatography A**, v. 905, n. 1-2, p. 269-279, 2001.

ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300009833> >.

GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 477-480, 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730700831X> >.

GRAY, D. E. et al. A Rapid Cleanup Method for the Isolation and Concentration of Pyrrolizidine Alkaloids in Comfrey Root. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 5, p. 1049-1057, // 2004. Disponível em: <
<http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2004/00000087/00000005/art00003> >.

GRAY, D. E. P., A.; O'NEILL, T.; HARRIS, R. K.; ROTTINGHAUS, G. E. A rapid cleanup method for the isolation and concentration of pyrrolizidine alkaloids in comfrey root. **J AOAC Int**, v. 87, n. 5, p. 1049-57, 2004. ISSN 1060-3271 (Print)

1060-3271 (Linking).

HARTMANN, T. et al. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. **Planta**, v. 177, n. 1, p. 98-107,

1989/01/01 1989. ISSN 0032-0935. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00392159>>.

HARTMANN, T.; TOPPEL, G. Senecionine n-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1639-1643, // 1987. ISSN 0031-9422. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220082261X>>.

HARTMANN, T. E., ADELHEID; EILERT, UDO; BORSTEL, KIRSTEN YON; THCURING, CLAUDINE Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. . **Planta**, v. 177, p. 98:107, 1989.

HILAL, S. E. A. In Quantitative Treatmens of solute/solvent interactions. **Theoretical and Computational Chemistry**, v. 1, p. 291-353, 1994.

HIRSCHMANN, G. S. et al. Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio brasiliensis* Populations. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 770-772, 1987/07/01 1987. ISSN 0163-3864. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1021/np50052a042>>. Acesso em: 2011/10/30.

HOESCH, G. et al. A new high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their

N-oxides in plant material. **Phytochem. Anal.**, v. 7, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 284-288, 1996. ISSN 0958-0344.

HOGBEN, C. A. M. et al. ON THE MECHANISM OF INTESTINAL ABSORPTION OF DRUGS. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 125, n. 4, p. 275-282, 1959. Disponível em: < <http://jpet.aspetjournals.org/content/125/4/275>.

HOSTETTMANN, K. Q., EMERSON F.; VIEIRA, PAULO C. Princípios Ativos de Plantas Superiores - Editora Universidade Federal de São Carlos. (**Série de textos da Escola de Verão em Química**, v. IV, p. 9, 2003.

JAMBHEKAR, S. S. **Biopharmaceutical properties of drug substances**. 4th ed. Media: 1995. 12-24.

KANSY, M. et al. **High-Throughput Artificial Membrane Permeability Studies in Early Lead Discovery and Development**. p.448–464. 2001

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998/03/01 1998. ISSN 0022-2623. Disponível em: <

<http://dx.doi.org/10.1021/jm970530e> >. Acesso em: 2013/12/10.

KEMPF, M. et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 3, p. 332-347, 2011/03/01 2010. ISSN 1944-0049. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.521772> >. Acesso em: 2014/01/19.

KREBS, H. C.; CARL, T.; HABERMEHL, G. G. Pyrrolizidine alkaloid composition in six brazilian senecio species. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1227-1229, 1996. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/els/00319422/1996/00000043/00000006/art00445> >. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00445-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00445-1) >.

KUMANA, C. R. et al. Hepatic veno-occlusive disease due to toxic alkaloid herbal tea. **Lancet**, v. 2, n. 8363, p. 1360-1, Dec 10 1983. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736.

LANGEL, D.; OBER, D.; PELSER, P. The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 1, p. 3-74, 2011. ISSN 1568-7767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-010-9184-y> >.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 4, p.

403-410, 1998. ISSN 1520-6017. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1021/js970332a>>.

LIN, G. et al. Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interface. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 20, p. 1445-1456, 1998. ISSN 1097-0231. Disponível em: <
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19981030\)12:20<1445::AID-RCM356>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981030)12:20<1445::AID-RCM356>3.0.CO)>.

LIN, G. Z., KE-YU; ZHAO, XIAN-GUO; WANG, ZHEN-TAO; BUT, PAUL PUI HAY. Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interface. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 20, p. 1445-1456, 1998. ISSN 1097-0231. Disponível em: <
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19981030\)12:20<1445::AID-RCM356>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981030)12:20<1445::AID-RCM356>3.0.CO;2-G)>.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 7// 2000. ISSN 1056-8719. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871900001076>>. Acesso em: 2000/8//.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3-25, 1/15/ 1997. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X96004231> >.

_____. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3-26, 3/1/ 2001. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X00001290> >.

LIU, F. et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 916-923, 12/15/ 2009. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009006699> >.

LIU, F. W., SOW YIN; JIANG, ZHANGJIAN; LI, SAM FONG YAU; ONG, ENG SHI; OSORIO, JHON CARLOS CASTAÑO. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 916-923, 2009. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009006699> >.

LODÉN, H.; AMINI, A. Quantification of buserelin in a pharmaceutical product by multiple-injection CZE. **ELECTROPHORESIS**, v. 28, n. 10, p. 1548-1556, 2007. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200600636> >.

LOIZZO, M. R. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Senecio inaequidens* DC. and *Senecio vulgaris* L. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 777-779, 2004. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1562> >.

MANDIC, B. M. et al. Pyrrolizidine alkaloids from seven wild-growing *Senecio* species in Serbia and Montenegro. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 74, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 27-34, 2009. ISSN 0352-5139.

MARTINELLO, M. et al. Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey. **Food Control**, v. 37, n. 0, p. 146-152, 3// 2014. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513004830> >.

MOHABBAT, O. et al. AN OUTBREAK OF HEPATIC VENO-OCCLUSIVE DISEASE IN NORTH-WESTERN AFGHANISTAN. **The Lancet**, v. 308, n. 7980, p. 269-271, 8/7/ 1976. ISSN 0140-6736.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673676907261> >.

MOLYNEUX, R. J. et al. ^{13}C NMR spectroscopy of Pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 439-443, // 1982. ISSN 0031-9422. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200952841> >.

MROCZEK, T. et al. Investigation of Symphytum cordatum alkaloids by liquid–liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 2, p. 157-166, 5/4/ 2006. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006005435> >.

MROCZEK, T. N.-I., KARINE; GŁOWNIAK, KAZIMIER; MIĘTKIEWIC-CAPAŁA, AGNIESZKA; HOSTETTSMANN, KURT. Investigation of Symphytum cordatum alkaloids by liquid–liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 2, p. 157-166, 2006. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006005435> >.

NAGAI, J. et al. Investigation of Daily Variation of Atmospheric Nitrophenols by Means of Inline

Preconcentration-HPLC/MS Analysis with Large Volume Injection. **BUNSEKI KAGAKU**, v. 62, n. 9, p. 775-783, 2013. ISSN 0525-1931.

NAVIA, M. A.; CHATURVEDI, P. R. Design principles for orally bioavailable drugs. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 5, p. 179-189, 5// 1996. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644696100209> >.

NGUTA, J. M. et al. Antimalarial herbal remedies of Msambweni, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 424-432, 2010. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110000504> >.

NILSSON, M. et al. Determination of protein-ligand affinity constants from direct migration time in capillary electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 12, p. 1829-1836, 2004. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200405918> >.

NORI-SHARGH, D.; RAFTARI, S.; DEYHIMI, F. Analysis of the essential oil of *Senecio vernalis* Waldst. & Kit. from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 5, p. 357-359, 2008. ISSN 1099-1026. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1860> >.

PALM, K. et al. Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 5, p. 568-571, 1997/05/01 1997. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012188625088> >.

PERES, L. E. P. **METABOLISMO SECUNDÁRIO**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz -USP: lady_carvalho7869 1-26 p. 2011.

POOLE, S. K. P., SNEHA; DEHRING, KAREN; WORKMAN, HEATHER; POOLE, COLIN F. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, n. 1-2, p. 445-454, 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304003632> >.

REINHARD, A. et al. Feeding Deterrence and Detrimental Effects of Pyrrolizidine Alkaloids Fed to Honey Bees (*Apis mellifera*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 9, p. 1086-1095, 2009/09/01 2009. ISSN 0098-0331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-009-9690-9> >.

_____. Feeding Deterrence and Detrimental Effects of Pyrrolizidine Alkaloids Fed to Honey Bees (<i>Apis mellifera</i>). **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 9, p. 1086-1095, 2009. ISSN 0098-0331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-009-9690-9> >.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDKER, P. M., OHKUMA, S., MC DERMOTT, W. V., TREY, C., HUXTABLE, R. J. Hepatic venoocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizidinecontaining dietary supplements. . **Gastroenterology**, v. 88, p. 1050-1054., 1985.

ROCHA, L. G. A., J.R.G.S.; MACÊDOB, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. . A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** v. 12 p. 514-535, 2005.

ROEDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, n. 2, p. 83-98, Feb 1995. ISSN 0031-7144 (Print)

0031-7144.

_____. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 55, n. 10, p. 711-26, Oct 2000. ISSN 0031-7144 (Print)

0031-7144.

SAFETY, I. I. P. O. C. **Pyrrolizidine alkaloids, environmental health criteria No. 80** ORGANISATION., W. H. Geneva: 1-345 p. 1988.

_____. **Poisons information monographs: Senecio vulgaris** L ORGANISATION., W. H. Geneva: 1-16 p. 1989b.

SAFETY., I.-I. P. O. C. **Pyrrolizidine alkaloids, health and safety guide No. 26** ORGANISATION, W. H. Geneva: 1-135 p. 1989a.

SCHOENTAL, R.; HEAD, M. A.; PEACOCK, P. R. Senecio alkaloids; primary liver tumours in rats as a result of treatment with (1) a mixture of alkaloids from *S. jacobaea* Lin.; (2) retrorsine; (3) isatidine. **Br J Cancer**, v. 8, n. 3, p. 458-65, Sep 1954. ISSN 0007-0920

SILVA, J. A. F. D. C., WENDELL KARLOS TOMAZELLI COLTRO E EMANUEL; TAVARES, MARINA FRANCO MAGGI TERMINOLOGIA PARA AS TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ELETROMIGRAÇÃO EM CAPILARES. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SIMÕES, C. M. O. S., ELOIR PAULO.; GOSMANN, GRACE; MELLO, JOÃO CARLOS PALAZZO DE; MENTZ, LILIAN AULER; PETROVICK, PEDRO ROS; . Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6ª edição. 2010.

STEGELMEIER, B. L. et al. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. **J Nat Toxins**, v. 8, n.

1, p. 95-116, Feb 1999. ISSN 1058-8108 (Print)1058-8108.

STILLMAN, A. S. et al. Hepatic veno-occlusive disease due to pyrrolizidine (Senecio) poisoning in Arizona. **Gastroenterology**, v. 73, n. 2, p. 349-52, Aug 1977. ISSN 0016-5085 (Print)0016-5085.

SUGANO, K. et al. Optimized conditions of biomimetic artificial membrane permeation assay. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1-2, p. 181-188, 10/9/ 2001. ISSN 0378-5173. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517301008456> >.

SÂRBU, C. et al. Chromatographic lipophilicity determination using large volume injections of the solvents non-miscible with the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1266, n. 0, p. 53-60, 11/30/ 2012. ISSN 0021-9673. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312015452> >.

TANDON, B. N. et al. An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. **Lancet**, v. 2, n. 7980, p. 271-2, Aug 7 1976. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736.

THOMAS, G. **Química Medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: 2003.

TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 345-351, Dec 2004. ISSN 0378-8741. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000225154500037 >.

_____. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 345-351, 2004. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104004003> >.

UGAZ, O. L. D. Investigación Fitoquímica - Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición 1994.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1174-1180, 1996/04/01 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac950968r> >. Acesso em: 2013/11/29.

WILLIAMS, B. A. V., GYULA. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1174-1180, 1996/04/01 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac950968r> >. Acesso em: 2013/10/17.

WITTE, L. et al. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 187-196, 1992. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942292801307> >.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water log P with Artificial Membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 923-930, 2001/03/01 2001. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm001020e> >. Acesso em: 2013/12/10.

WUILLOUD, J. C. A. et al. Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. **Analyst**, v. 129, n. 2, p. 150-156, 2004. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B311030C> >.

WUILLOUD, J. C. A. G., SAMUEL R.; GAMBLE, BRYAN M.; WOLNIK, KAREN A. Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-

oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. **Analyst**, v. 129, n. 2, p. 150-156, 2004. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B311030C> >.

XIE, W.-D.; LI, X.; ROW, K. H. **A New Pyrrolizidine Alkaloid from *Senecio vulgaris***. Bull. Korean Chem. Soc. 31: 2715 p. 2010.

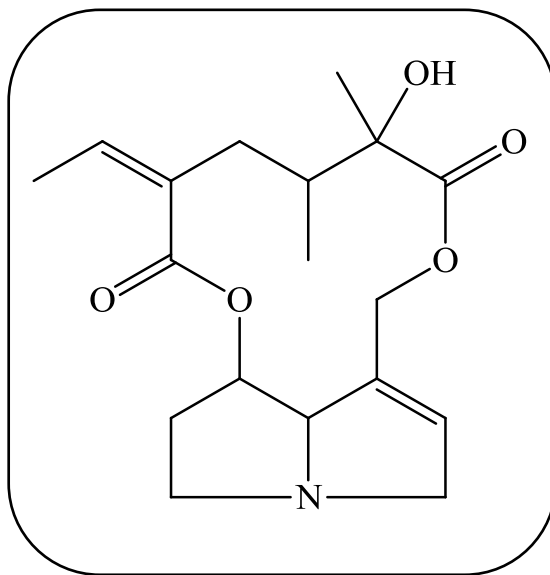
ZHANG, B. et al. Rapid determination of protein binding constant by a pressure-mediated affinity capillary electrophoresis method. **ELECTROPHORESIS**, v. 32, n. 24, p. 3589-3596, 2011. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100211> >.

ŠTĚDRÝ, M. J., MICHAL; GAŠ, BOHUSLAV. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 187-198, 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730200239X> >.

ŠTĚDRÝ, M. J., MICHAL; GAŠ, BOHUSLAV; JAROŠ, MICHAL; VČELÁKOVÁ, KATEŘINA; GAŠ, BOHUSLAV. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **ELECTROPHORESIS**, v. 24, n. 3, p. 536-547, 2003.

ISSN 1522-2683. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1002/elps.200390061> >.

8. Anexos



Dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear para alcalóide pirrolizidínico senecionina[1] isolado a partir da espécie *Senecio brasiliensis*

senecionina				
Nº	DEPT	δCppm	δH-C	¹ H- ¹³ C- (HMBC- ³ J)
C1	C=C	131,56		5,4-4,1 (H9a e b); 3,4 (H3)
C2	CH	136,44	6,21 (br. s., 1 H)	5,4-4,1 (H9a e b); 3,4 (H3)
C3	CH2	62,43	3,40 (dd, J=1.00 Hz, 1 H); 3,96 (d, J=16.02 Hz, 1 H)	
C5	CH2	53,1	2,46 - 2,56 (m, 1 H); 3,27 (m, 1 H)	3,4 (H3a)
C6	CH2	33,77	2,18 (d, J=13.68 Hz, 1 H); 2,42 (dd, J=1.00 Hz, 1 H)	
C7	CH	75,29	5,01 (m, 1H)	
C8	CH	77,22	4,33 (br. s., 1 H)	5,4-4,10 (H9 a e b)
C9	CH2	60,75	4,10 (d, J=11.72 Hz, 1 H) ; 5,41 (d, J=12.11 Hz, 1 H)	
C11	C=O	178,2		1,32 (H18);5,4-4,1 (H9 a e b)
C12	C	76,56		0,9 (H19); 1,32 (H18)
C13	CH	39,48	1,77 (d, 1 H)	0,9 (H19); 1,32 (H18)
C14	CH2	29,55	1,97 (d, J=13.29 Hz, 1 H), 2,19 (d, J=3.52 Hz, 1 H)	0,9 (H19); 6,5 (H20)
C15	C=C	133,81		1,75 (H21); 1,77 (H13)
C16	C=O	169,01		6,51 (H20)
C18	CH3	25,15	1,32 (s, 3 H)	
C19	CH3	11,77	0,91 (d, J=6.64 Hz, 3 H)	
C20	CH	135,5	6,51 (q, J=7.03 Hz, 1 H)	1,75 (H21)
C21	CH3	14,2	1,75 (d, J=7.03 Hz, 3 H)	

Figura 38: Espectro de RMN ^1H do alcalóide pirrolizidinico senecionina [1]

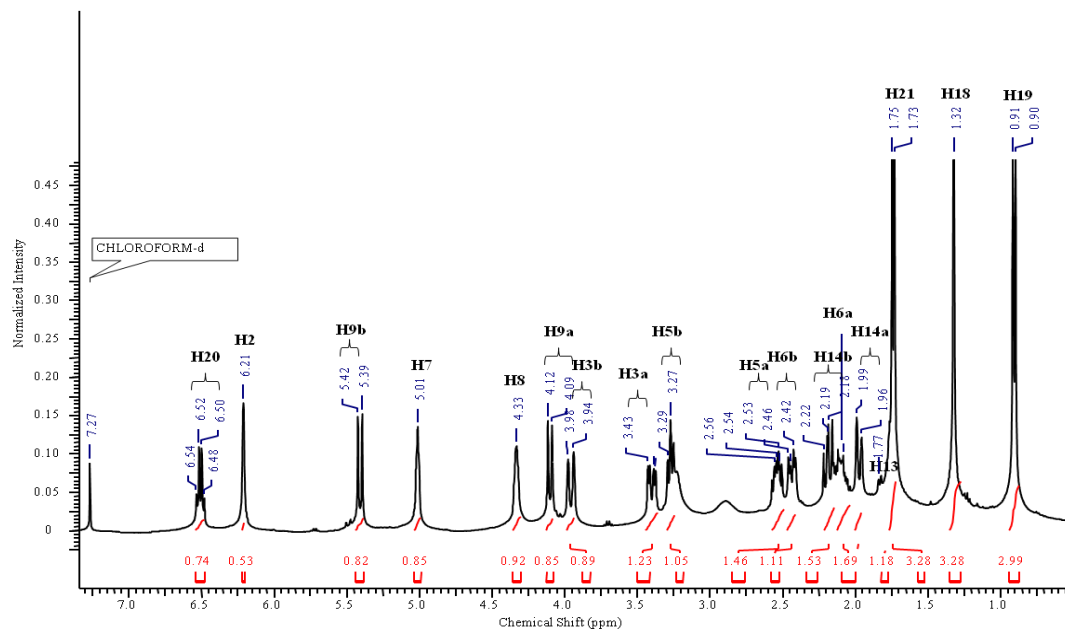


Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1]

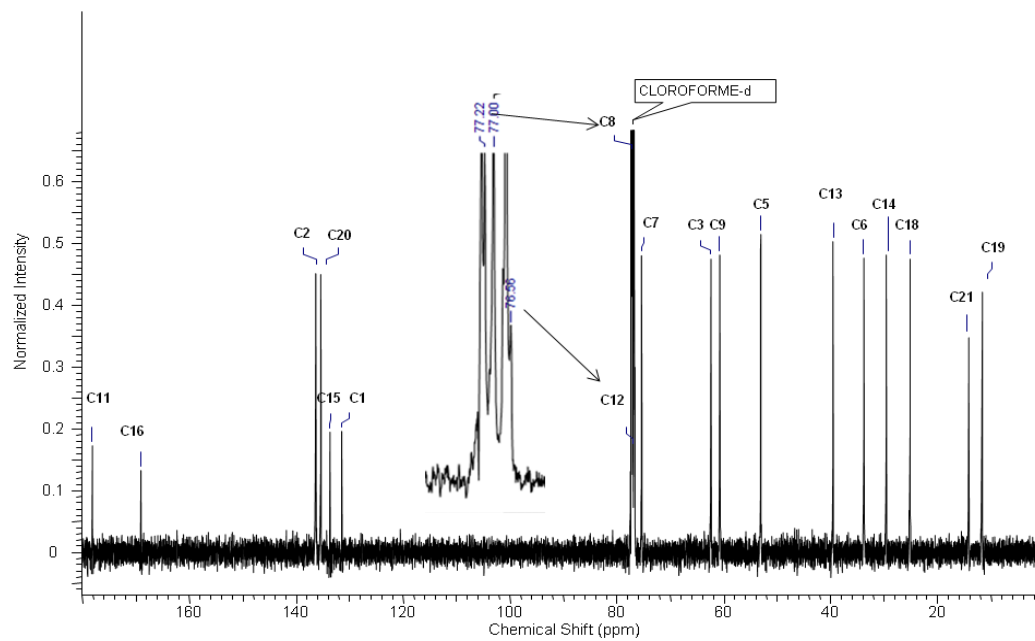


Figura 40: Espetro de DEPT 135 de alcalóides pirrolizidinico Senecionina [1]

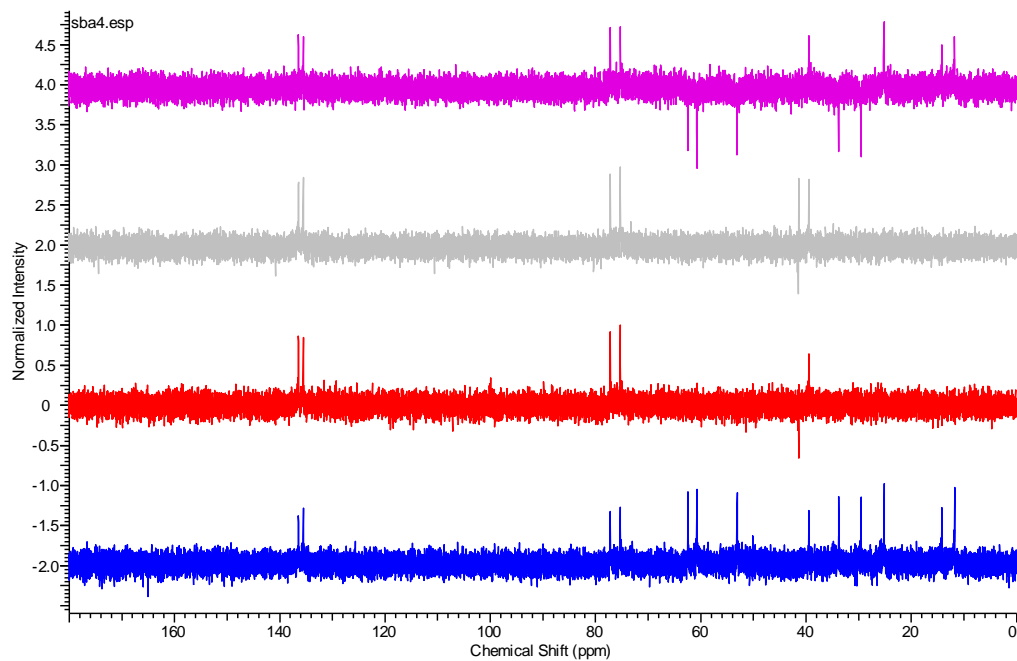


Figura 41: HMQC de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1]

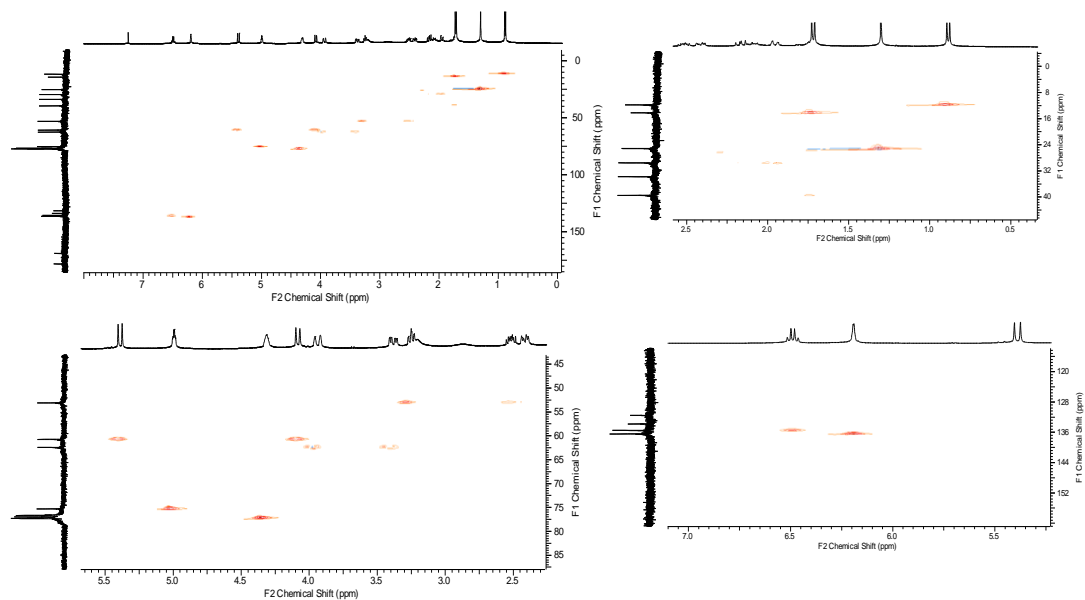
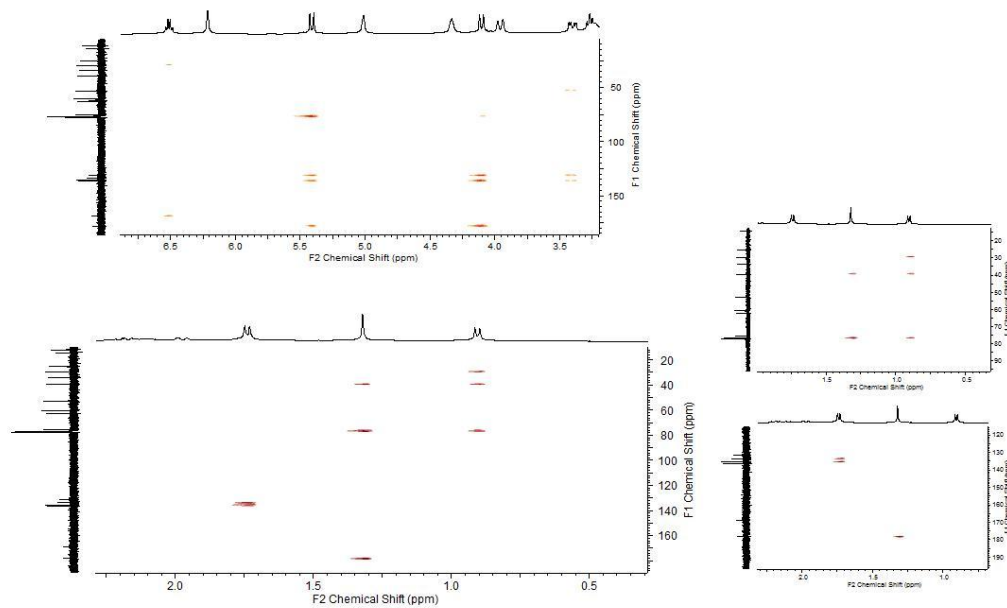
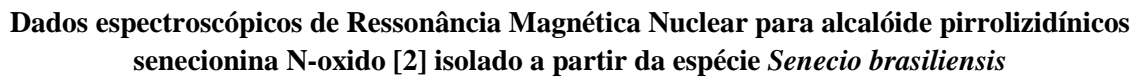


Figura 42: HMBC de alcalóide pirrolizidinico Senecionina [1]





N°	DEPT	δC _{ppm}	δH-C
C1	C=C	129,72	-
C2	CH	138,1	6,27 (m, 1 H)
C3	CH ₂	78,33	3.86 (ddd, J=11.43, 7.33, 4.30 Hz, 1 H); 3.67 (td, J=10.75, 6.64 Hz, 1 H)
C5	CH ₂	60,75	2.89 - 3.03 (m, 2 H), 3.26 (br. s., 1 H)
C6	CH ₂	32,45	2.23 (m, H); 2.43 (dd, 1 H)
C7	CH	73,65	4.80 (d, J=5.47 Hz, 1 H)
C8	CH	95,78	4.83 (dd, 1 H)
C9	CH ₂	69,02	4.22 (d, J=12.11 Hz, 1 H); 5.46 (m, 2 H)
C11	C=O	178,06	-
C12	C	77,48	-
C13	CH	39,5	1.86 (m, 1H)
C14	CH ₂	29,38	1.97 (d, J=13.29 Hz, 1 H), 2.16 - 2.27 (m, 2 H)
C15	C=C	132,43	-
C16	C=O	168,08	-
C18	CH ₃	25,1	1.34 (s, 3 H)
C19	CH ₃	11,8	0.92 (d, J=7.03 Hz, 3 H)
C20	CH	131,32	6.65 (q, J=6.80 Hz, 1 H)
C21	CH ₃	14,44	1.79 (s, 3 H)

Figura 43: Espectro de RMN ^1H do alcalóide pirrolizidinico N-óxido senecionina[2]

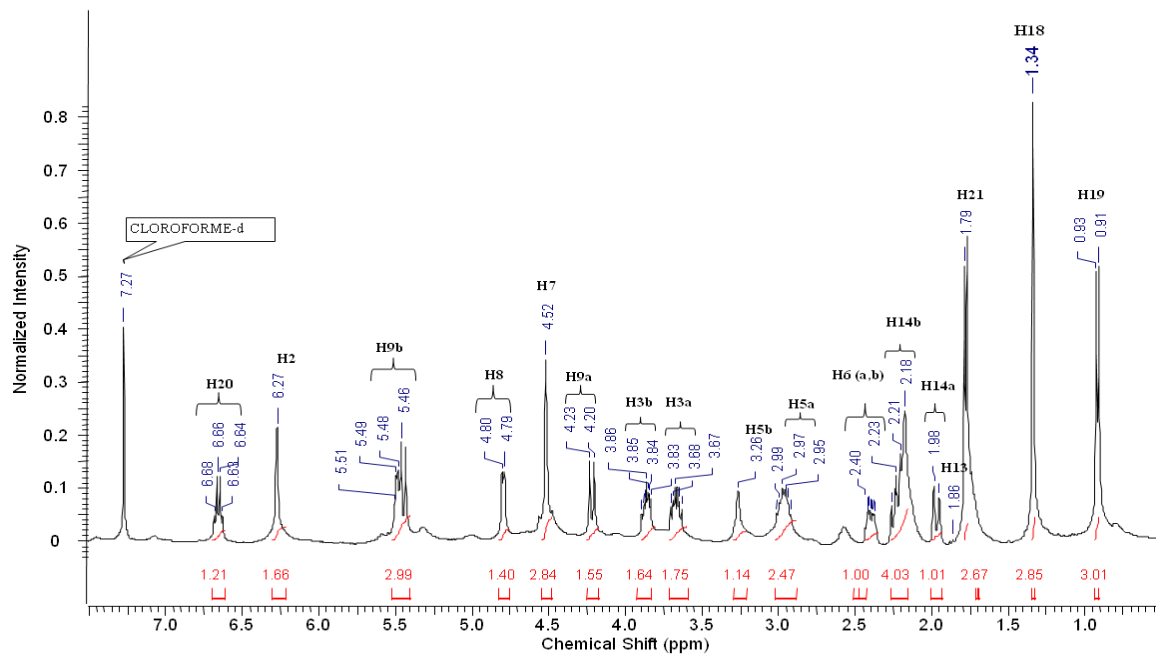


Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide pirrolizidínico N-óxido Senecionina[2]

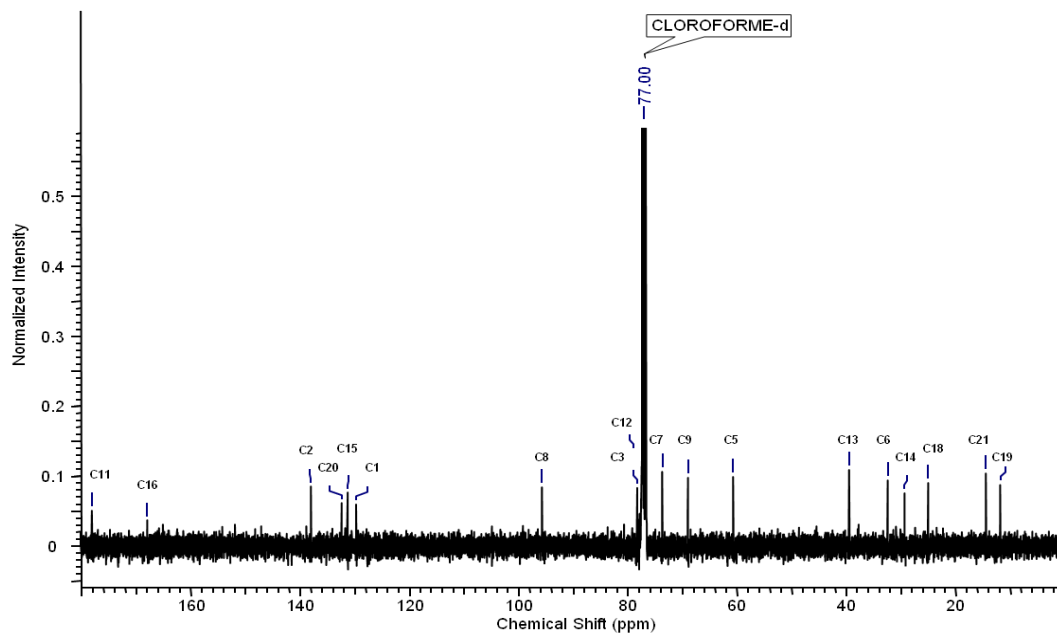


Figura 45: Espectro de RMN DEPT 135 do alcalóide pirrolizidinico N-óxido Senecionina[2]

